

**Synthese und Untersuchung von künstlichen und  
natürlichen Calciumphosphaten sowie  
Kapazitätsbestimmung von Phosphatbindern**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

**Thorsten Peitsch**

geboren in Essen

Institut für Anorganische Chemie

der

Universität Duisburg-Essen

**2009**

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2006 bis Juli 2009 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Matthias Epple am Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 17.12.2009

Gutachter:	Prof. Dr. Matthias Epple
	Prof. Dr. Axel Schönbucher
Vorsitzender:	Prof. Dr. Christian Mayer

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>5</b>
<b>2. Theoretische Grundlagen</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Kristallisation</b>	<b>6</b>
2.1.1 Calciumphosphate	9
2.1.2 Fluorapatit	11
2.1.3 Biomineralisation	15
2.1.4 Knochen und Zähne	16
2.1.5 Niereninsuffizienz und Hyperphosphatämie	19
2.1.6 Knochenstoffwechsel	20
<b>2.2 Chemische Reaktortypen</b>	<b>21</b>
2.2.1 Ideal durchmischter Rührkesselreaktor / Batchreaktor (BR)	21
2.2.4 Einschränkungen des Idealbilds bei realen Reaktoren	25
<b>3. Methoden</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Rasterelektronenmikroskopie</b>	<b>26</b>
3.1.1 Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM)	27
3.1.2 Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)	28
<b>3.2 Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD)</b>	<b>29</b>
<b>3.3 Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)</b>	<b>31</b>
<b>3.4 Atomic Force Microscopy (AFM)</b>	<b>33</b>
<b>3.5 UV-Vis Spektroskopie zur Phosphatbestimmung</b>	<b>35</b>
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>42</b>
<b>4.1 Fluorapatit</b>	<b>42</b>
4.1.1 Einleitung	42
4.1.2 Einfluss verschiedener Versuchsparameter auf die Morphologien von Fluorapatit	43
4.1.3 Ausrichtung von Fluorapatitnadeln im elektrischen Feld	48
4.1.4 Fluorapatitkristallisation unter Dialyse	54
4.1.5 Zusammenfassung	66

<b>4.2 Untersuchungen an menschlichen Zähnen nach Ätzung zur orthodontischen Fixierung und Bleichung</b>	<b>67</b>
4.2.1 Einleitung	67
4.2.2 Die Aufrauung von Zähnen durch Ätzung	68
4.2.3 Probenpräparation	69
4.2.4 ESEM Aufnahmen der geätzten Zähne	71
4.2.5 3D-Rekonstruktion aus rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen	74
4.2.6 AFM-Untersuchungen an geätzten Zähnen	81
4.2.7 Untersuchungen an gebleichten Zähnen	89
4.2.8 Untersuchung Nanopartikelhaltiger Zahncremes zur Reparatur von Defekten im Zahnschmelz	93
4.2.9 Diskussion	99
<b>4.3 In-vitro Untersuchungen an beim Menschen eingesetzten Phosphatbindern</b>	<b>101</b>
4.3.1 Einleitung	101
4.3.2 Eingesetzte Phosphatbinder und Chemikalien	102
4.3.3 Apparativer Aufbau	103
4.3.4 Experimentelle Durchführung	105
4.3.5 Theoretische Betrachtung des Reaktors	107
4.3.6 Auswertung	110
4.3.7 Ergebnisse	114
4.3.8 Diskussion und Vergleich mit Reinstoffen	125
4.3.9 Zusammenfassung und Vergleich	135
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>139</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>140</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>145</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>145</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>146</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>147</b>
<b>Erklärung</b>	<b>148</b>
<b>Danksagung</b>	<b>149</b>

## 1. Einleitung und Zielsetzung

Nach Vorarbeiten auf dem Gebiet der Calciumphosphate<sup>[1]</sup>, insbesondere der Apatite und ihrer verschiedenen Morphologien<sup>[2]</sup>, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nadelförmiger Fluorapatit hergestellt werden, da dieser den Kristalliten in menschlichen Zähnen ähnelt. Die Abhängigkeit dieser schnell nach Kristallisationsbeginn auftretenden Fluorapatitmorphologie von den Versuchsbedingungen wie pH-Wert, Ionenkonzentration, Temperatur und Versuchsdauer wurde systematisch untersucht, um ein Produkt mit Kristalliten einer einzigen Form zu erhalten. Um auch die noch nicht reagierten Ionen aus der Lösung zu entfernen, wurde ein Ansatz zur Kristallisation unter Dialyse konzipiert und eingesetzt.

Da die Oberfläche des menschlichen Zahnschmelzes Schädigungen durch den Kontakt mit Säuren davonträgt und diese auch im kieferorthopädischen Bereich bei der Befestigung von Zahnsparren eingesetzt werden, wurden humane Proben mit verschiedenen Methoden behandelt und untersucht, um mehr über die Natur und Abnutzung ihres kristallinen Materials unter Säureeinwirkung zu erfahren. Dazu wurde eine dreidimensionale Erfassung der Oberflächentopographie über eine Software und direkt abbildender Verfahren durchgeführt, um Aussagen über das Ausmaß der Schädigungen treffen zu können.

Außerdem wurden die Phosphatbindekapazitäten der aktuell am häufigsten verschriebenen Klassen von Phosphatbindern für die Behandlung von Dialysepatienten experimentell bestimmt und verglichen. Da dies in einem dafür nach Vorbild des menschlichen Verdauungstrakts entworfenen *in-vitro* Aufbau durchgeführt wurde, konnten erstmals die Vor- und Nachteile verschiedener Wirkstoffe direkt verglichen werden.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1 Kristallisation

Kristalle sind einheitlich zusammengesetzte feste Körper, die von regelmäßig angeordneten ebenen Flächen begrenzt sind. Viele Mineralien bilden aufgrund ihrer inneren Struktur solche Formen aus. Die Kristallform bzw. das Kristallsystem ist von der chemischen Zusammensetzung und den Bedingungen bei der Kristallisation abhängig. Damit bezeichnet man Keimbildung und Wachstum von Kristallen, die aus einer Lösung, einer Schmelze, der Gasphase, einem amorphen Festkörper oder auch aus einem anderen Kristall entstehen können. Dieser Prozess beginnt mit der Phase der Kristallkeimbildung oder Nukleation, woran sich das Kristallwachstum anschließt, bei dem in den meisten Fällen Kristallisationswärme frei wird. Die Nukleation ist ein kinetisch gehemmter Vorgang und es muss zunächst die Keimbildungsarbeit aufgebracht werden, um eine kritische Keimgröße zu erreichen, ab der dann die Phasenumwandlung eintritt. Eine Lösung, die durch Überschreitung des Löslichkeitsprodukts eines Stoffes zwar übersättigt ist, aber aus der aufgrund der noch nicht erfolgten Nukleation keine Kristalle ausfallen, bezeichnet man als metastabil. Wird die Aktivierungsenergie ohne weitere Maßnahmen überschritten und aus der Lösung kristallisiert ein Feststoff aus, spricht man von homogener Keimbildung. Durch Zugabe von Impfkristallen oder auch Gefäßunregelmäßigkeiten und Verunreinigungen kann die Keimbildung gefördert werden und wird dann heterogen genannt<sup>[3]</sup>.

Beim Kristallwachstum lagern sich neue Ionen bevorzugt an Orten mit hoher Adsorptionsenergie an, wie z. B. Ecken, Kanten oder auch Defekten<sup>[4]</sup>, weshalb einerseits ein Kristall entlang bestimmter Vorzugsrichtungen schneller wächst als in andere, und es andererseits manchmal schwierig ist, Einkristalle zu züchten. Das Wachstum dauert so lange an, bis das Löslichkeitsprodukt des betreffenden Stoffs in der Lösung erreicht ist und somit kein weiteres Material

mehr ausfallen kann. Trotzdem ist dann kein statischer Zustand erreicht, da es permanent zur Auflösung zuvor ausgefallten kristallinen Materials und neuer Kristallisation an anderer Stelle kommt, wodurch sich die Ionenkonzentration der Lösung nicht mehr ändert. Aufgrund der größeren spezifischen Oberfläche lösen sich dabei kleine Kristalle zugunsten großer Kristalle auf, was man als Ostwald-Reifung bezeichnet. Das Endprodukt der Ostwald-Reifung wäre ein einzelner Einkristall, allerdings kann es neben den beim Wachstum möglichen Defekten auch zur Aggregation von Kristalliten kommen. Dadurch entstehen im Kristall Korngrenzen, womit man Bereiche unterschiedlicher Orientierung im Kristall bezeichnet, die aber aus dem gleichen Material bestehen.

Zur Kristallbildung aus einer Lösung muss diese zunächst übersättigt am auszukristallisierenden Stoff sein. Dies kann durch verschiedene Prozesse hervorgerufen werden, z.B. durch Abkühlungsprozesse von Lösungen oder durch Verdampfen des Lösungsmittels. Bei Kristallen, die aus mehreren Komponenten bestehen, kann die Übersättigung auch durch Mischen von zwei Lösungen erreicht werden, die jeweils eine der Komponenten enthalten. Dabei ordnen sich die zuvor gelösten Moleküle bzw. Elemente in einer regelmäßigen, teils stoffspezifischen Form an. Es kann jedoch auch zuerst ein amorphes Produkt entstehen, das sich danach in den thermodynamisch stabileren kristallinen Zustand umwandelt. Dabei können auch kinetisch kontrolliert metastabile Zwischenstufen durchlaufen werden. So können bei einem System, das mehrere energetisch nicht zu verschiedene Phasen bilden kann, zuerst instabilere Modifikationen gebildet werden. Diese ordnen sich erst mit der Zeit in die stabilste Phase um. Diesen Umstand nennt man Ostwaldsche Stufenregel. Bei Calciumphosphaten kommt es durchaus zu solchen Phänomenen, was zwar nicht zu Polymorphie, aber Produkten unterschiedlicher Stöchiometrie führt.

In den letzten Jahren wird auch die Kristallisation durch die Bildung von Mesokristallen<sup>[5]</sup> diskutiert, bei der nicht Ionen sich an einen Keim anlagern, sondern durch Additive stabilisierte Kristallite nanoskopischer Größe. Diese

sogenannte nichtklassische Kristallisation wird dadurch unabhängiger von Löslichkeiten, pH-Werten oder Ionenprodukten und ist aktuell Gegenstand weiterer Forschung<sup>[6,7]</sup>.

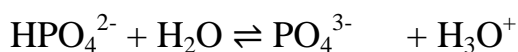
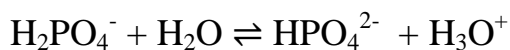
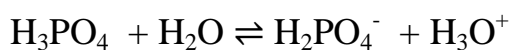


### 2.1.1 Calciumphosphate

Die Calciumphosphate<sup>[1]</sup> sind die Calcium-Salze der Meta-, Di- Tri- und Ortho-Phosphorsäure. Die Calciumorthophosphate, die für diese Dissertation von besonderem Interesse sind, sind im reinen Zustand weiße Festkörper, wobei sie in natürlichen Vorkommen häufig wegen des Einbaus von Übergangsmetallionen farbig sind. Sie sind nur wenig oder gar nicht in Wasser löslich, lösen sich jedoch alle in Säure.

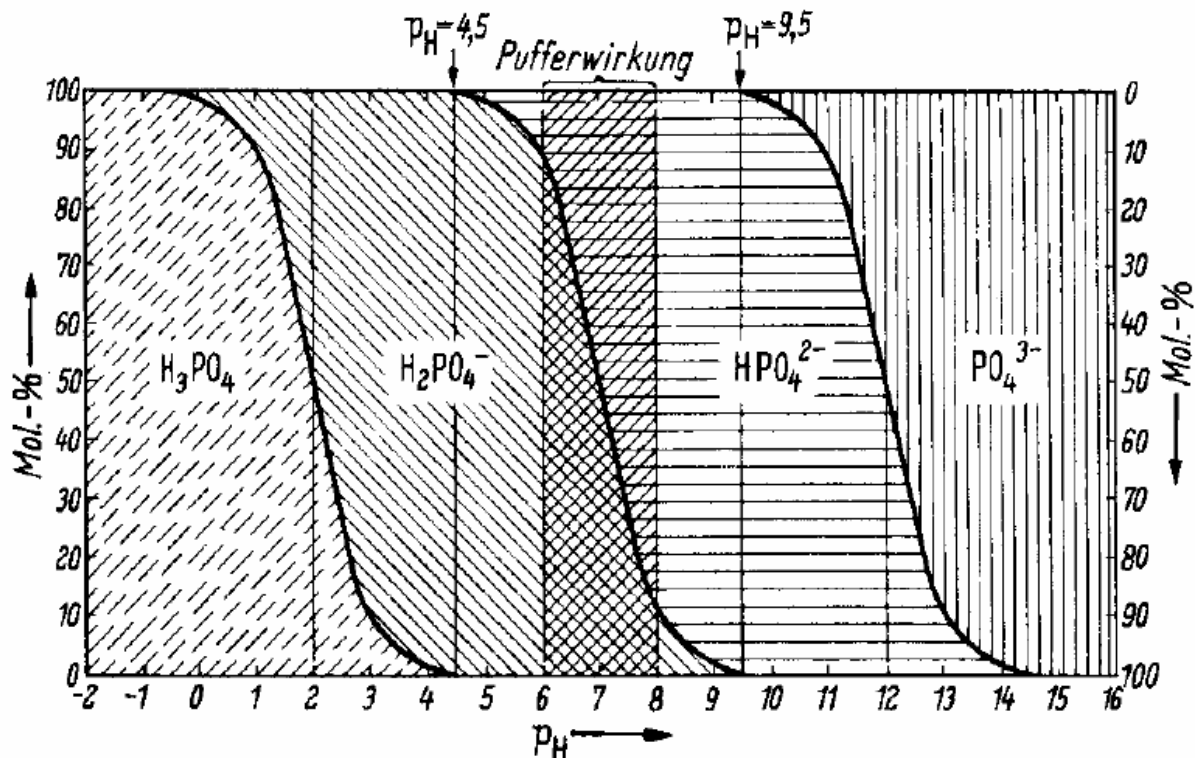
Sie können aus allen Dissoziationsstufen der dreibasigen Phosphorsäure gebildet werden, wobei die Dissoziationsstufen  $\text{HPO}_4^-$  und  $\text{PO}_4^{3-}$  die Hauptbestandteile der anorganischen Mineralphase von Knochen und Zähnen der Säugetiere sind. Die geologisch vorkommenden und beispielsweise in den USA, Russland oder Marokko<sup>[8,9]</sup> gefundenen Calciumphosphate wie Fluorapatit oder Phosphorite erreichen in vielen Jahren Wachstum Größen von bis zu einem Meter und treten selten sogar als gewachsene Einkristalle auf. Die von lebenden Organismen durch Biomineralisation aufgebauten Calciumphosphate sind fast immer nanokristallin; eine Ausnahme bilden die Stacheln des Seeigels, die aus einem Calcit-Einkristall bestehen<sup>[10]</sup>.

Aufgrund der drei Protolysestufen der Orthophosphorsäure zeigt diese eine für diese Arbeit wichtige Pufferwirkung um die pH-Werte 2 und 7, da dort mit 2.16 und 7.21 die  $\text{pK}_s$ -Werte zur Abspaltung je eines Protons liegen. Das letzte Proton wird erst unter stark basischen Bedingungen bei  $\text{pK}_s=12.33$  abgespalten.



Eine graphische Darstellung ist in Abb. 2.1.1.1 gezeigt.

Aus den unterschiedlichen Protolysegraden der Phosphorsäure und den Reaktionsbedingungen ergeben sich diverse Calciumphosphatphasen, die in Tabelle 2.1.1.2 zusammengefasst sind<sup>[1]</sup>:



**Abb. 2.1.1.1:** Konzentrationsabhängige Dissoziationsbereiche der Orthophosphorsäure<sup>[11]</sup>; Pufferwirkung um  $pH=7$  schraffiert in der Mitte, bei 2 und 12 nicht eingezeichnet, aber an fallender Kurve erkennbar.

Verbindung	Abkürzung	Ca/P-Verhält.	Chemische Formel	Lösl. 25 °C [-log( $K_{SP}$ )]	Lösl. 37 °C [-log( $K_{SP}$ )]
Monocalciumphosphat-Monohydrat	MCP M	0.5	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	1.14	Keine Daten
Monocalciumphosphat-Anhydrat	MCPA	0.5	$Ca(H_2PO_4)_2$	1.14	Keine Daten
Dicalciumphosphat-Dihydrat (Brushit)	DCPD	1.0	$CaHPO_4 \cdot 2 H_2O$	6.59	6.63
Dicalciumphosphat-Anhydrat (Monetit)	DCPA	1.0	$CaHPO_4$	6.90	7.02
Octacalciumphosphat	OCP	1.33	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5 H_2O$	96.6	95.9
$\alpha$ -Tricalciumphosphat	$\alpha$ -TCP	1.5	$\alpha$ - $Ca_3(PO_4)_2$	25.5	25.5
$\beta$ -Tricalciumphosphat	$\beta$ -TCP	1.5	$\beta$ - $Ca_3(PO_4)_2$	28.9	29.5
Amorphes Calciumphosphat	ACP	1.2-2.2	$Ca_x(PO_4)_y \cdot n H_2O$	nicht genau bestimmt	nicht genau bestimmt
Calcium-defizitärer Hydroxylapatit	CDHA	1.5-1.67	$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$ ( $0 < x < 1$ )	~85.1	~85.1
Hydroxylapatit	HA	1.67	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	116.8	117.2
Tetracalciumphosphat	TTCP	2.0	$Ca_4(PO_4)_2O$	38-44	37-42

**Tabelle 2.1.1.2:** Calciumphosphatverbindungen mit Abkürzungen und molarem Ca/P Verhältnis. Die Löslichkeiten sind als Logarithmus des Ionenprodukts für die angegebene Formel (ohne H<sub>2</sub>O) mit Konzentrationen in mol L<sup>-1</sup> angegeben.

Die in obiger Tabelle zusammengefassten Calciumphosphate werden allgemein an ihrem Calcium-Phosphat-Verhältnis und ihrer Löslichkeit unterschieden. Im Rahmen dieser Arbeit waren insbesondere HAP, OCP, DCPD und FAP (Fluorapatit) von Interesse.

### 2.1.2 Fluorapatit

Der Apatit ist ein Calciumphosphat der allgemeinen Formel Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>X mit X = F, OH oder Cl. Er ist ein weit verbreitetes Mineral und kann große Kristalle bilden, die bis zu 100 kg wiegen können. In reiner Form weiß, kommt er in der Natur oft farbig vor durch den Ersatz von Ca durch Mn, Fe oder anderen Metallen.

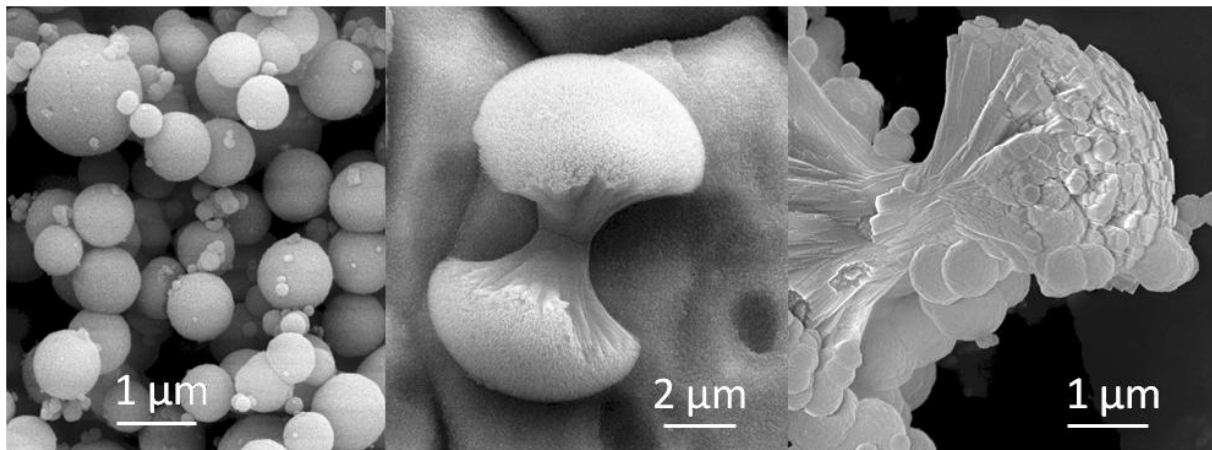


**Abb. 2.1.2.1:** Mineralischer Fluorapatit, gefärbt durch Übergangsmetallionen <sup>[1]</sup>

Fluorapatit<sup>[2]</sup> ist der in der Natur am häufigsten auftretende Apatit und zeichnet sich durch eine noch geringere Löslichkeit<sup>[12]</sup> als Hydroxylapatit aus. Strukturell sind sich beide Minerale sehr ähnlich und röntgendiffraktometrisch<sup>[13]</sup> kaum zu unterscheiden. Bei Lebewesen kommt FAP in der Form von Haifischzähnen<sup>[14]</sup> und Molluskenschalen<sup>[15]</sup> vor.

Eine Anreicherung von Zahnpasta mit Fluorid bewirkt einen teilweisen Austausch der Hydroxylgruppen im Zahnschmelz, wodurch dessen Säurebeständigkeit steigt.

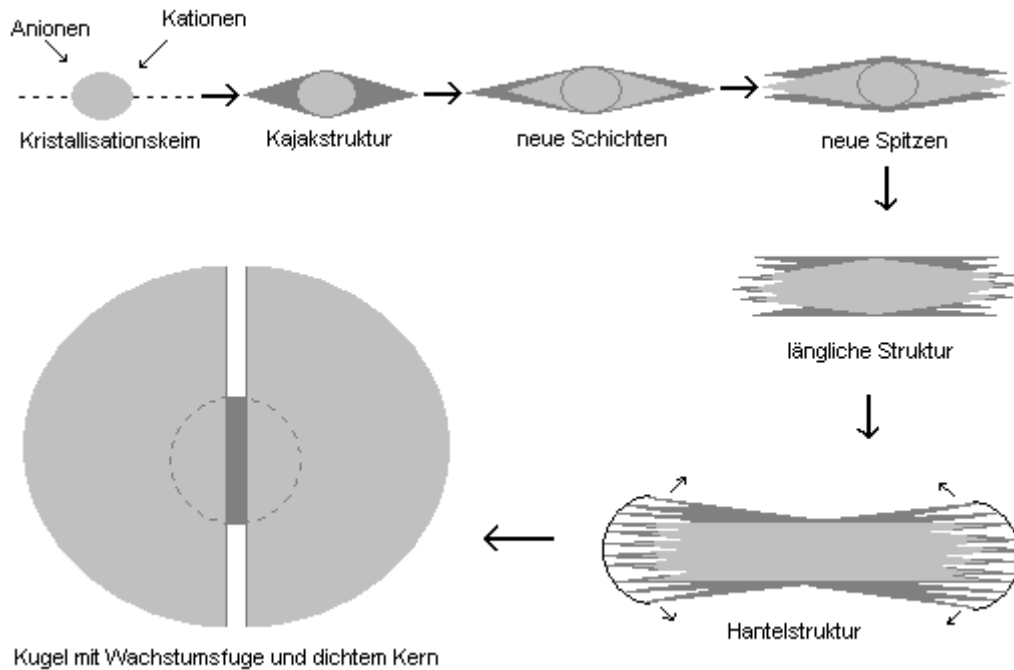
Interessant ist Fluorapatit auch wegen der vielen verschiedenen Morphologien, die er abhängig von den Kristallisationsbedingungen bildet.



**Abb. 2.1.2.2:** Verschiedene Morphologien des Fluorapatits<sup>[2]</sup>

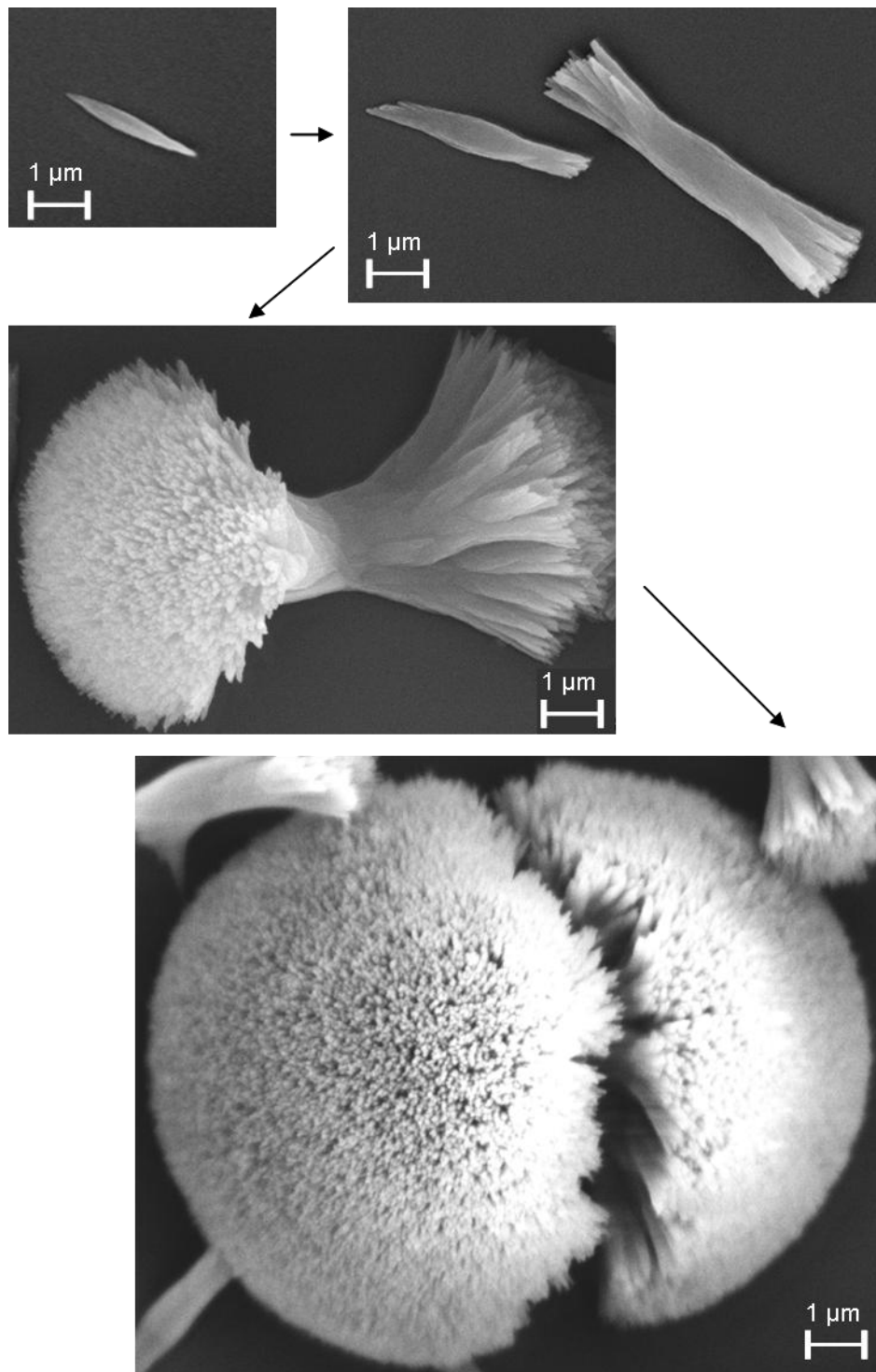
Mit kompakten Kugeln (links), sich zu größeren Kugeln schließenden Hanteln (mittig) und hexagonalen Strukturen (rechts) ist in Abb. 2.1.2.2 eine Auswahl an möglichen Fluorapatitmorphologien gezeigt.

Ein Ansatz zur Erklärung besonderer Kristallmorphologien sind Wechselwirkungen mit einer Gelatinematrix<sup>[14,16-19]</sup>. Da Epple et al. jedoch alle bekannten Morphologien ohne Zusätze nur durch Variation der Versuchsbedingungen synthetisieren konnten<sup>[2]</sup>, ist eine ausschließlich auf Gelatine beruhende Argumentation nicht schlüssig.



**Abb. 2.1.2.3:** Möglicher Mechanismus zur Entstehung von bestimmten Fluorapatitmorphologien.<sup>[2]</sup>

In Abb. 2.1.2.3 ist schematisch dargestellt, wie die Entwicklung der verschiedenen Morphologien während des Kristallwachstums von FAP abläuft. Zuerst entstehen kleine Kristallkeime, an die sich weitere Ionen anlagern. Dabei entsteht eine Kajakstruktur, die groß genug ist, um unter dem Rasterelektronenmikroskop erkennbar zu sein. An diese lagern sich neue Schichten an, die ihrerseits in die Länge wachsen und somit die typischen länglichen Strukturen mit vielen Spitzen bilden. Diese spreizen sich im weiteren Wachstumsverlauf immer weiter auf, wobei die unten gezeigten Hanteln entstehen. Diese schließen sich soweit, bis sich ihre Enden berühren und sie somit eine große Kugel mit Wachstumsfuge bilden.



**Abb. 2.1.2.4:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Entwicklungsstufen des Fluorapatits von der Kajakstruktur bis zur Kugel

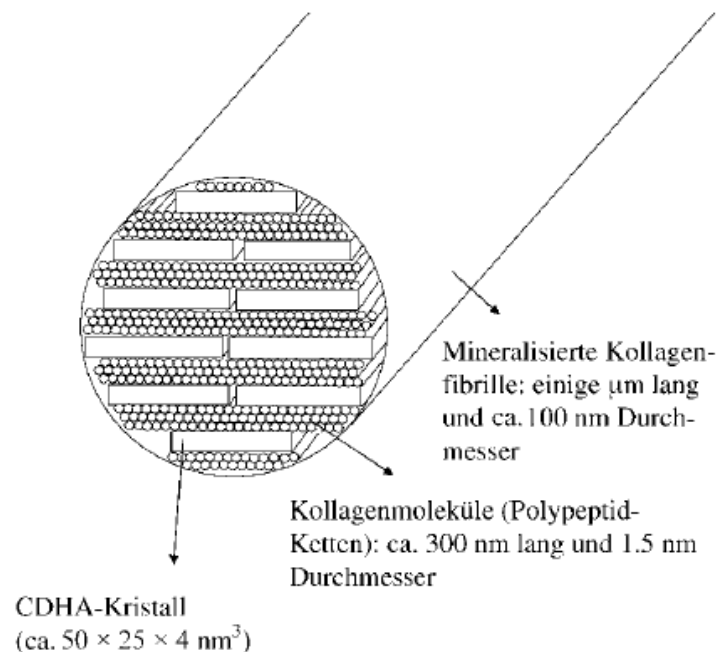
### 2.1.3 Biomineralisation

Als biologische Mineralisation (Biomineralisation<sup>[20]</sup>) wird die Nutzung von anorganischen Mineralien durch lebende Organismen bezeichnet. Dies können Calciumphosphate wie in menschlichen Knochen und Zähnen, Calciumcarbonate in Mollusken und marinen Einzellern, Eisenoxide in Bakterien und Schnecken Zähnen und viele weitere sein. Die Biomineralisation wird gesteuert über Biomoleküle, die die Bereitstellung von organischen Matrizen, auf denen die Biominerale aufwachsen, koordinieren. In der Regel handelt es sich um Glycoproteine, die als Matrizen für Kristallisationskeime dienen. Beim weit verbreiteten Biomineral Calciumcarbonat, das z.B. in Muschel- und Schnecken Schalen vorkommt, beobachtet man eine Festigkeit, die man vom reinen Calciumcarbonat nicht erwarten würde. Als Mineral ist dieses leicht durch externe Krafteinwirkung spaltbar, durch den Verbund mit einer organischen Matrix erhält es jedoch eine höhere Festigkeit und ist deutlich bruchstabiler.

Nicht erwünschte Biomineralisation kommt mit der sogenannten pathologischen Verkalkung auch im menschlichen Körper vor, wobei die Ablagerungen, z.B. Nieren- und Blasensteine nicht aus Calciumcarbonat („Kalk“), sondern vor allem aus Calciumphosphat besteht. In den Industrieländern stirbt ein hoher Prozentsatz der Bevölkerung letztendlich an Arteriosklerose.

### 2.1.4 Knochen und Zähne

Knochen und Zähne<sup>[1]</sup> gehören zu den Hartgeweben des menschlichen Körpers. Die Knochen dienen dem Körper als Gerüst und geben ihm neben den Gelenken als Hebel für den Muskelansatz auch einen Schutz für das Gehirn, Rückenmark, die Sinnesorgane und das Knochenmark. Makroskopisch betrachtet ist der Knochen von außen nach innen aus der bindegewebsartigen Knochenhaut (Periost), dem kompakten Knochenmaterial (Corticalis), dem schwammartigen Knochenmaterial (Spongiosa) und dem Knochenmark aufgebaut. Im Knochenmark werden die meisten menschlichen Blutzellen gebildet. Die Knochenhartschubstanz dient als Speicher für Calcium und Phosphat für verschiedene metabolische Zwecke. Beim Knochenmineral handelt es sich um sogenannten CDHA (*calcium-deficient hydroxyapatite*), also calciumdefizitären Hydroxylapatit, in dem diverse andere Kationen wie  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und Anionen wie  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  und  $\text{F}^-$  vorkommen.



**Abb. 2.1.4.1:** Schematische Darstellung einer mineralisierten Kollagenfibrille<sup>[1]</sup>.

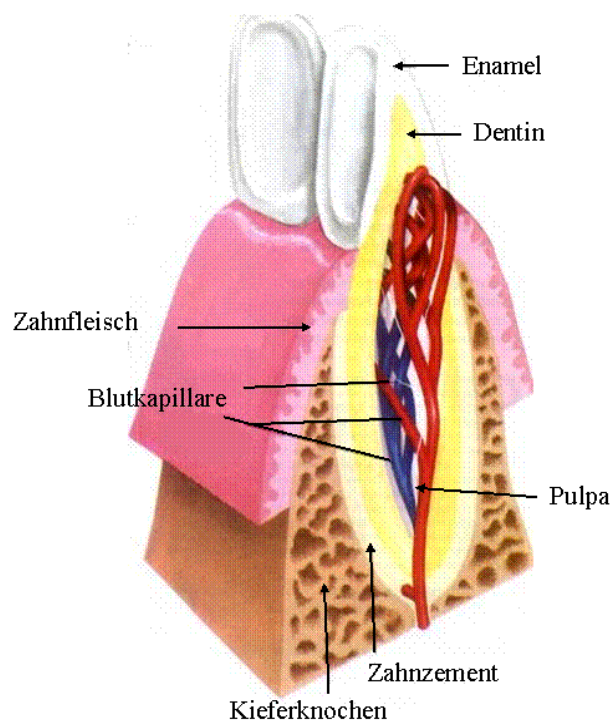
Mikroskopisch ist die Knochensubstanz aus mineralisierten Kollagenfibrillen aufgebaut, die einen Durchmesser von etwa 100 nm und eine Länge von mehr



als 10  $\mu\text{m}$  aufweisen. Darin sind plättchenförmige Apatitkristalle in Polypeptidketten eingelagert, was den Knochen materialwissenschaftlich betrachtet zu einem Verbundwerkstoff macht.

Knochen werden permanent von spezialisierten Zellen auf- und abgebaut, die Osteoklasten übernehmen dabei durch die Ausbildung eines sauren Kompartiments und dem Einsatz von Kollagenasen den Abbau sowohl des mineralischen als auch des organischen Anteils. Der Aufbau neuen Knochenmaterials wird von den Osteoblasten geleistet, die dazu Calcium und Phosphat aus dem Blut anreichern und zusammen mit Kollagenmolekülen ausscheiden. Dieser Remodelling genannte Prozess steht beim gesunden Menschen im Gleichgewicht; eine häufige Störung ist die Osteoporose, bei der der Knochenabbau überwiegt. Da es sich um ein dynamisches Gleichgewicht handelt, ist es dem Körper möglich auf besondere Belastungen mit vermehrten Auf- oder Abbau zu reagieren.

Zähne sind die zweite wichtige Hartschubstanz im menschlichen Körper.



**Abb. 2.1.4.2:** Schematische Darstellung eines Zahns im Kieferknochen<sup>[21]</sup>

Der Grundkörper eines Zahns besteht aus dem Zahnbein oder Dentin, welches in seinem Aufbau dem zuvor beschriebenen Knochenmaterial ähnelt. An der Krone ist der Zahn mit dem Schmelz oder Enamel überzogen, der härtesten Substanz im menschlichen Körper. Er besteht zu ca. 99% aus CDHA-Kristallen mit einer Länge von bis zu 100  $\mu\text{m}$  und enthält kein Kollagen. Es wird nur bei der Zahnbildung im Kieferknochen generiert. Einmal abgebautes Enamel wird nicht durch Remodelling wieder aufgebaut, allerdings ist der Speichel an CDHA übersättigt, sodass es bei kleineren Schäden, z. B. durch Säure in der Nahrung, zu einer passiven Remineralisierung kommt.

Die Zähne sind symmetrisch in einem Zahnfach der Alveolarfortsätze des Ober- und Unterkiefer befestigt, als Bindemittel zwischen Knochen und Zahn dient der Zahnzement. Durch die Zahnwurzel gelangen Nerven und Blutgefäße ins Zahnmark bzw. die Pulpa.

Mikroskopisch betrachtet ist vor allem der Zahnschmelz interessant, denn obwohl dieser kaum organische Moleküle enthält, ist er doch streng hierarchisch aufgebaut. Beim Menschen sind die Kristalle parallel ausgerichtet.



**Abb. 2.1.4.3:** Hierarchisch angeordnete Calciumphosphat-Schmelzprismen innerhalb eines Rattenzahns, Bildbreite 50-60  $\mu\text{m}$

### 2.1.5 Niereninsuffizienz und Hyperphosphatämie

Die Nieren<sup>[22]</sup>, durch die täglich mehr als 1500 Liter Blut fließen, filtrieren mit der Nahrung aufgenommene überschüssige Mineralien, darunter auch Phosphat, aus dem Blut und scheiden diese aus. Bei einer eingeschränkten Funktion der Niere können oftmals harnpflichtige, also nur über den Harn abführbare Substanzen, wie zum Beispiel stickstoffhaltige Endprodukte des Proteinstoffwechsels<sup>[23]</sup>, nur beschränkt ausgeschieden werden. Dadurch gehen Anpassungsmöglichkeiten im Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Base-Haushalt des Körpers verloren. Somit können giftige Substanzen nicht ausgeschieden werden, und es kommt zu einer Vergiftung des Organismus, was zu einem Nierenversagen<sup>[24]</sup> führen kann (Niereninsuffizienz). Dabei unterscheidet man zwischen akutem und chronischem Nierenversagen. Beide Krankheitsbilder lassen sich in vier Stadien unterteilen und werden je nach Voranschreiten mit Medikamenten, Infusionen und Dialyse behandelt. Mit einer chronischen Niereninsuffizienz geht nicht nur ein unumkehrbarer Gewebeverlust einher, sondern auch Knochenveränderungen, die man mit harntreibenden Medikamenten zu behandeln versucht. Im Endstadium verlaufen beide Erkrankungsformen tödlich.

Eine häufige Folge der Niereninsuffizienz ist eine Hyperphosphatämie<sup>[25]</sup>, was eine Erhöhung des Phosphatspiegels im Blut darstellt. Durch eine Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate<sup>[26]</sup> um mehr als 2/3 wird die Niere in ihrer Funktion so sehr beeinträchtigt, dass dies zu einer verminderten Phosphatausscheidung führt. Ein chronischer Phosphatüberschuss, welcher vor allem bei Dialysepatienten häufig vorkommt, kann mit Phosphatbindern medikamentös behandelt werden.

### 2.1.6 Knochenstoffwechsel

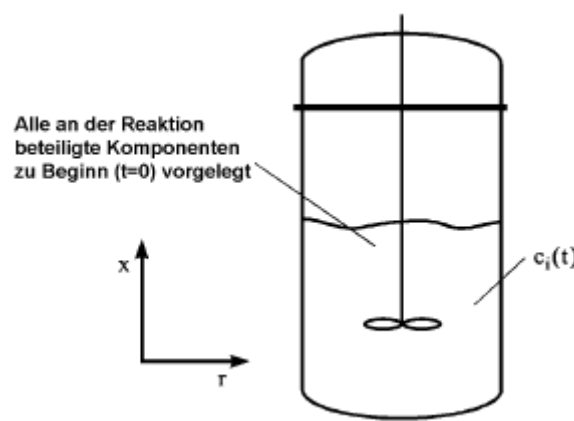
Calcium und Phosphat sind lebenswichtige Mineralien, welche über Magen und Darm in den Blutkreislauf strömen. Dabei sind die Knochen der größte Mineralspeicher. Mehr als 99% des Calciums und 85% des Phosphats sind im Knochen lokalisiert, bilden die Bausubstanz der Knochen und sind verantwortlich für die Stabilität des Skeletts. Eine eingeschränkte Funktion der Niere kann Einfluss auf den Knochenstoffwechsel haben<sup>[27]</sup>. Die Niere bildet Vitamin D (Kalzitriol), welches als Hormon unter anderem die Calciumaufnahme aus dem Darm fördert und zusammen mit der Nebenschilddrüse den Calciumspiegel im Blut kontrolliert. Bei einer Niereninsuffizienz kommt es zu einer geringeren Bildung von Kalzitriol, und es entwickelt sich ein Calciummangel, der zu einer Schilddrüsenüberfunktion führt. Dabei wird das Hormon Parathormon freigesetzt, welches den Knochenabbau stimuliert, damit Calcium und Phosphat freigesetzt werden. Eine ständige Aktivierung der Nebenschilddrüse zum Knochenabbau führt jedoch zu einer starken Knochendemineralisierung (Osteomalazie). Dies kann in Anfangsstadien zu Beschwerden im Bewegungsapparat führen und im späteren Verlauf zu Knochenbrüchen. Zudem verbindet sich das freigesetzte Calcium mit dem nicht ausgeschiedenen Phosphat im Blutkreislauf. Eine Ablagerung des dabei entstehenden Produkts zusammen mit diversen organischen Bestandteilen in Arterien und Geweben wird auch „Verkalkung“ genannt, obwohl es sich beim Kalk im chemischen Sinne um Calciumcarbonat handelt. Deshalb ist die medizinische Bezeichnung Arteriosklerose vorzuziehen.

Durch Einnahme von Phosphatbindern kann man einem erhöhten Phosphatspiegel im Körper entgegenwirken, indem das Phosphat in Magen und Darm gebunden und über den Stuhl ausgeschieden wird.

## 2.2 Chemische Reaktortypen

In der chemischen Reaktionstechnik<sup>[28-30]</sup> werden diverse Typen von Reaktoren unterschieden, die oft auch miteinander gekoppelt sind. Im Folgenden sollen einige isotherme Grundtypen vorgestellt werden, die zum Verständnis der im Rahmen dieser Doktorarbeit konzipierten und verwendeten Anlagen notwendig sind.

### 2.2.1 Ideal durchmischter Rührkesselreaktor / Batchreaktor (BR)



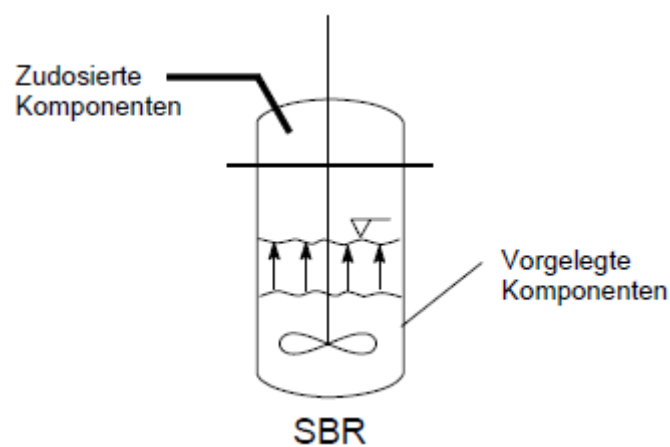
**Abb. 2.2.1.1:** Isothermer Batchreaktor

In einen ideal durchmischten Rührkesselreaktor, auch Batchreaktor genannt, werden alle Edukte und eventuell Lösungsmittel vor Reaktionsbeginn vorgelegt und die Reaktion gestartet. Die Konzentration der Edukte und Produkte ist im isothermen Zustand nur zeitabhängig

Die Vorteile beim Betrieb von Batchreaktoren sind unter anderem deren Anpassungsfähigkeit an die Qualität der Edukte und Produkte, wie auch die Möglichkeit, verschiedene Reaktionen im gleichen Reaktor durchzuführen. Dieser Umstand sowie die relativ geringen Investitionskosten machen Batchreaktoren zu den kostengünstigsten Reaktoren. Da die Produktmenge begrenzt ist, werden meist Spezialprodukte in relativ kleinen Mengen im Batchbetrieb produziert, außerdem ist die Gefahr einer „durchgehenden“ Reaktion, eines sogenannten *runaways*, wesentlich geringer als bei kontinuierlichen Anlagen. Auch für Reaktionen mit sehr langen Reaktionszeiten

werden oft Batchreaktoren benutzt ebenso wie für Bioreaktoren, die eine spezielle Konsistenz der Reaktionsmasse erfordern.

Die Nachteile des Batchbetriebs sind die relativ hohen Betriebskosten, die durch die vielen Arbeitsschritte wie Befüllen, Erwärmen, Abkühlen, Entleeren und Reinigen entstehen, welche sich nur unter hohem Kostenaufwand voll automatisieren lassen. Dementsprechend braucht man gut ausgebildetes Personal zum Betrieb von Batchreaktoren, außerdem ist die Möglichkeit der Energieeinsparung durch Wärmeübertragung nur sehr begrenzt gegeben.



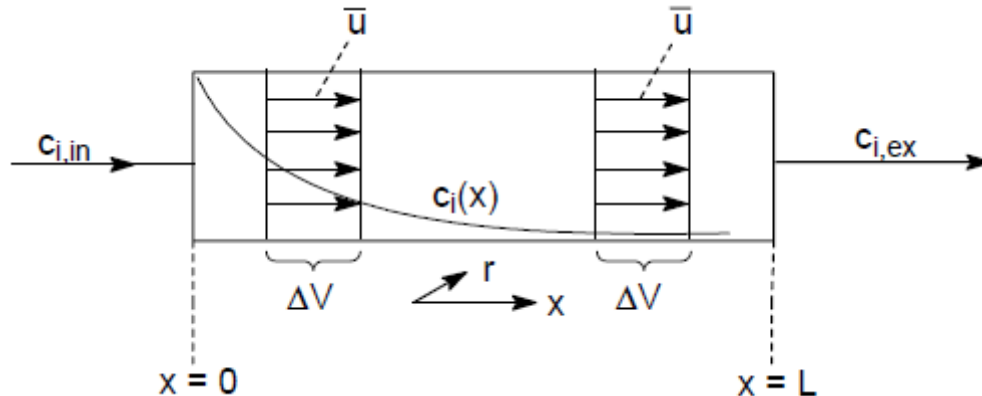
**Abb. 2.2.1.2:** Isothermer Semibatchreaktor

Vom Batchreaktor leitet sich der Semibatchreaktor ab, bei dem ein oder mehrere Edukte erst mit der Zeit zur Reaktionsmasse dosiert werden. Oft wird diese Art der Reaktionsführung bei stark exothermen Reaktionen gewählt, um *runaways* zu vermeiden.

Trotz Wärmeentwicklung ist eine quasi-isotherme Reaktionsführung durch Variation der Dosierate möglich, das Personal muss allerdings noch besser geschult sein, um den richtigen Zeitpunkt dafür zu erkennen. Bei zu schneller, zu früher oder zu später Dosierung kann es zu sowohl zu einem Durchgehen als auch zu einem Einschlafen der Reaktion kommen, wobei auch verwendete Katalysatoren beschädigt werden können. Die Zunahme des Volumens und der somit steigende Füllgrad des Reaktors müssen ebenfalls berücksichtigt werden.

Im Gegensatz zum einfachen Batchreaktor sind die Konzentrationen im Semibatchreaktor von Zeit, zudosierten Edukten und Volumen abhängig.

### 2.2.2 Idealer Rohrreaktor / Plug Flow Tube Reactor (PFTR)



**Abb. 2.2.2.1:** Isothermer Rohrreaktor<sup>[30]</sup>

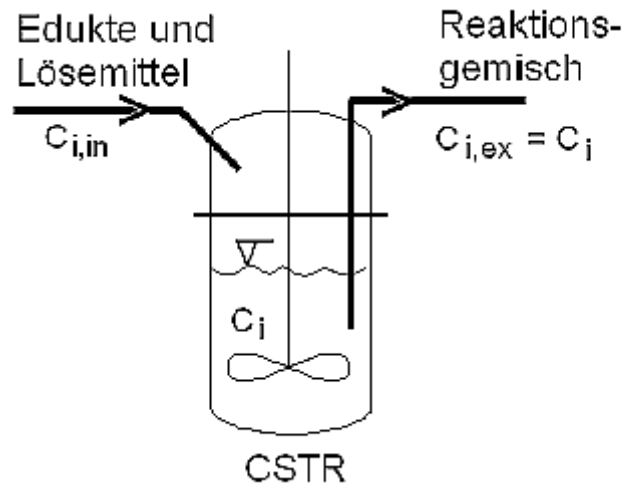
Durch den idealen Rohrreaktor, auch *Plug Flow Tube Reactor* (PFTR), fließen isolierte Volumenelemente und eine Rückvermischung ist definitionsgemäß ausgeschlossen. Es liegt also eine sogenannte Kolben- oder Pfropfenströmung vor, wobei die lineare Strömungsgeschwindigkeit  $\bar{u}$  in jedem Rohrquerschnitt  $S$  senkrecht zur Strömungsrichtung konstant ist. Die Konzentration der Edukte sinkt mit Fortschreiten der Reaktionsmasse durch den Reaktor, wohingegen die der Produkte steigt, die Konzentrationen sind also ortsabhängig ( $x$ ).

Der größte Vorteil eines PFTR ist die Möglichkeit zum kontinuierlichen Betrieb und damit zur Massenproduktion. Er lässt sich im Vergleich zum Batchreaktor leicht automatisieren und verursacht somit geringere Lohnkosten. Durch die gute Regulierbarkeit der Reaktionsbedingungen über den gesamten Verlauf des Reaktors ist eine gleichbleibende Produktqualität besser zu erreichen. Der Betrieb des PFTR ist sicherer und umweltfreundlicher, zumal auch je nach Reaktion die Möglichkeit der Energierückgewinnung besteht.

Allerdings ist ein einmal automatisierter Rohrreaktor weniger flexibel und eine Änderung der Marktsituation, sowohl auf der Edukt- als auch auf der Produktseite, erfordert neue Investitionen. Diese müssen auf jeden Fall getätigt

werden, da die Produktionskosten des PFTR nur dann unter denen des Batchreaktors liegen, wenn die Automatisierung vorgenommen wurde.

### 2.2.3 Kontinuierlich betriebene Rührkesselreaktoren (CSTR)



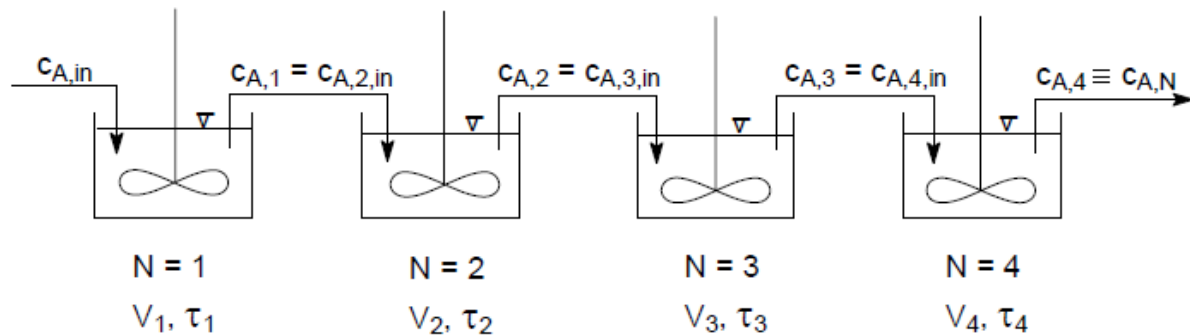
**Abb. 2.2.3.1:** Isothermer kontinuierlicher Rührkessel<sup>[30]</sup>

Der kontinuierlich betriebene Rührkesselreaktor oder auch *Continuously Stirred Tank Reactor* (CSTR) ist eine Art Kombination aus BR und PFTR. Es werden permanent Edukte zudosiert und Reaktionsgemisch entnommen.

Im Idealfall wird davon ausgegangen, dass es zu einer augenblicklichen Totalvermischung aller Komponenten kommt, die Konzentration an jedem Ort des Reaktors also gleich ist. Die thermische Beherrschbarkeit eines CSTR ist durch intensive Durchmischung und kleinere Umsätze leichter als beim PFTR, außerdem können im Rührkessel Emulsionen und Suspensionen aufrechterhalten werden. Bei reversiblen Reaktionen ist auch ein selektiver Ausschluss eines Produkts möglich, die Kontrolle von Polymerisationsreaktionen ist ebenfalls leichter.

Mehrere in Serie geschaltete CSTRs mit jeweils eigenem Volumen und Raumzeit  $\tau$  werden Kaskade genannt, die sich für  $N \rightarrow \infty$  wie ein PFTR verhält.





**Abb. 2.2.3.2:** Vier zu einer Kaskade hintereinandergeschaltete CSTRs

## 2.2.4 Einschränkungen des Idealbilds bei realen Reaktoren

In realen Reaktoren kann es zu diversen Abweichungen vom zuvor beschriebenen idealisierten Verhalten kommen. In Rührkesselreaktoren wie BR, SBR und auch CSTR können Totzonen auftreten, in denen die Reaktionsmasse schlecht oder überhaupt nicht mehr durchmischt wird, und somit nicht mehr in vollem Umfang an den ablaufenden Reaktionen teilnimmt. Es kommt praktisch zu einer Verringerung des Reaktorvolumens und einem Verlust an Edukt und Produkt. Beim realen kontinuierlich betriebenen Rührkessel CSTR kann nicht mehr von einer augenblicklichen totalen Vermischung ohne Konzentrationsgradienten bei Zugabe eines Edukts ausgegangen werden. Es kann zu Kurzschlussströmungen kommen, bei denen zugegebenes Produkt den Reaktor wieder verlässt, ohne vollständig reagiert zu haben.

Beim idealen Rohrreaktor PFTR wird die Rückvermischung kategorisch ausgeschlossen und es werden nur isolierte Volumenelemente angenommen; in der Realität kommt es allerdings sehr wohl zu Rückvermischungen, weshalb man die Edukt- und Produktkonzentrationen an einer bestimmten Stelle im Reaktor nicht einfach vorhersagen kann, sondern messen muss, um die Reaktionsbedingungen der Reaktionsmasse anzupassen.

### 3. Methoden

Folgende technische und analytische Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt.

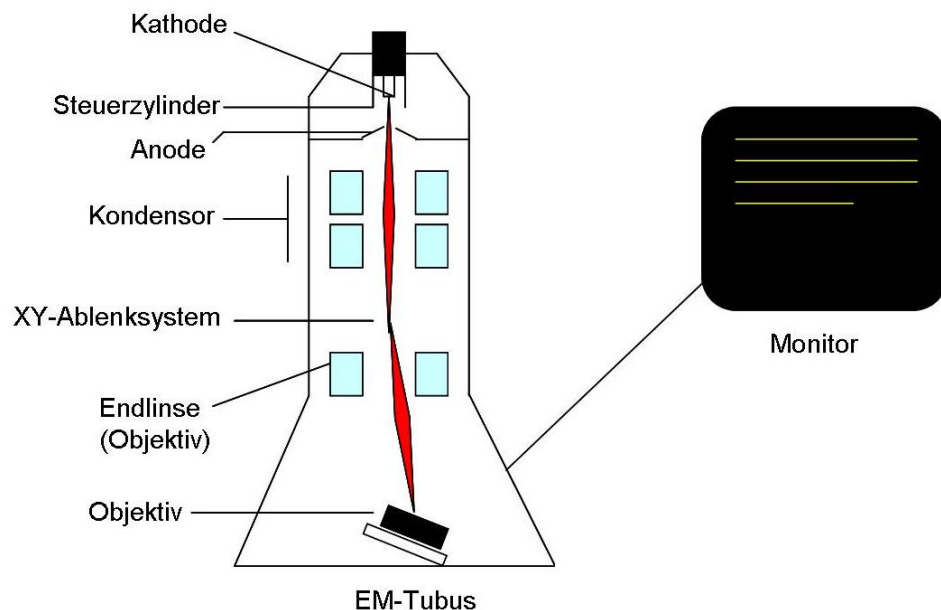
#### 3.1 Rasterelektronenmikroskopie

Das Rasterelektronenmikroskop<sup>[31,32]</sup> (REM) ist ein Elektronenmikroskop, bei dem ein Elektronenstrahl mit einem bestimmten Muster über das abzubildende Objekt geführt wird. Dabei wird ein Bild erzeugt, indem Elektronen mit dem Objekt in Wechselwirkung treten. Die Abbildungen der Objektoberflächen weisen eine hohe Tiefenschärfe auf und können maximal 1.000.000:1 vergrößert werden.

Das REM basiert auf der Abrasterung der Objektoberfläche mittels eines feingebündelten Elektronenstrahls. Um Wechselwirkungen mit Atomen und Molekülen in der Luft zu vermeiden, findet die Reaktion normalerweise im Hochvakuum statt. Magnetspulen helfen, den Elektronenstrahl auf einen Punkt auf der zu untersuchenden Probe zu fixieren. Trifft dieser Strahl auf das Objekt, so entstehen verschiedene Wechselwirkungen, aus denen man Informationen über die Beschaffenheit des Objekts erhält.

Beim Rastern wird der Elektronenstrahl wie bei einem Fernseher über die Oberfläche des Objekts geführt. Das entstandene Signal wird in Grauwertinformationen umgewandelt und auf dem Monitor dargestellt. Da in der Rasterelektronenmikroskopie nur leitende Oberflächen dargestellt werden können, müssen die Proben speziell präpariert werden. Durch Aufdampfen eines Metallfilmes (z. B. Gold, Palladium), der sogenannten Sputterung, können so auch die Oberflächen biologischer Objekte Leitfähigkeit erhalten. Dabei ist darauf zu achten, dass die Schicht nicht zu dick aufgedampft wird, da sonst die feinen Strukturen des Objekts abgedeckt werden. Da die Abtastung mit dem

Elektronenstrahl im Hochvakuum stattfindet, müssen die Objekte außerdem vor dem Bedampfen so präpariert werden, dass sie absolut wasserfrei sind.



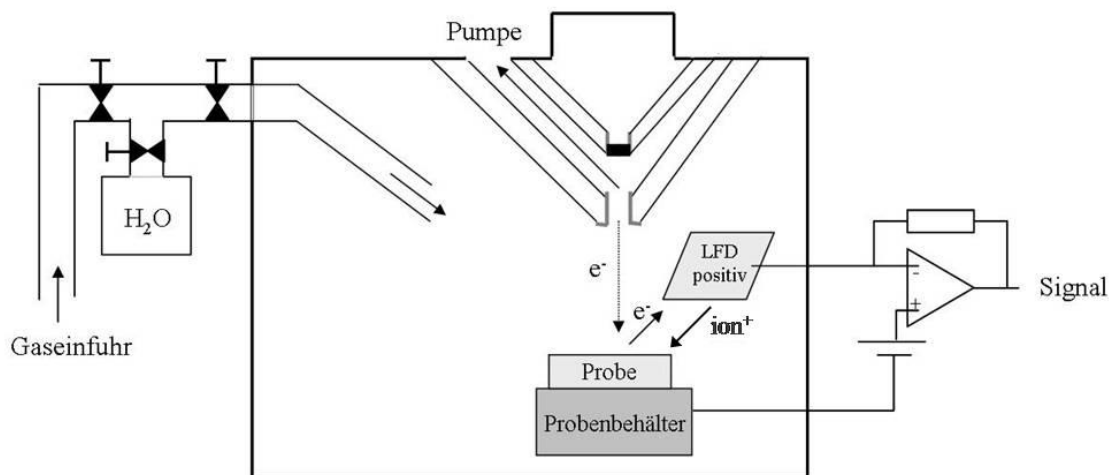
**Abb. 3.1.1:** Schematischer Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops

### 3.1.1 Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM)

Das *Environmental Scanning Electron Microscope*<sup>[33]</sup> (ESEM) gehört in die Gruppe der Rasterelektronenmikroskopie (REM). Der Unterschied zum REM ist der höhere Druck, der in der Kammer vorliegt. Die zu untersuchende Probe wird wie beim REM von einem fokussierten Elektronenstrahl abgerastert, und das bei der Wechselwirkung mit der Probe entstehende Signal wird als Bild aufgezeichnet. Jedoch ist die Probe beim ESEM von einem Gas umgeben, wie z.B. Wasserdampf, Stickstoff oder Luft, und befindet sich nicht unter Hochvakuum. Der Gasdruck liegt dabei etwa bei 120-1000 Pa. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass kein leitfähiger Metallfilm auf die Probe gedampft werden muss, da die Gasatome bzw. Moleküle für den Elektronentransport sorgen.

Wenn der Elektronenstrahl auf die Probe trifft, so entstehen verschiedene Wechselwirkungen auf der Probenfläche. Im ESEM Betrieb entstehen aus niederenergetischen Sekundärelektronen, welche auf die Probenfläche treffen,

langsame Elektronen. Um ein stärkeres Signal zu erhalten, wird das Gas in der Probenkammer selbst genutzt. Durch eine angelegte Spannung zwischen Probe und Detektor werden die Sekundärelektronen zum Detektor hin beschleunigt. Bei dieser Reaktion kommt es zu Stößen zwischen den Elektronen und den Gasatomen. Dadurch werden die Atome ionisiert, und es entstehen neue Elektronen. Das Bild, welches aus diesem Signal entsteht, entspricht hauptsächlich einem Topographiekontrast. Die nun ionisierten Gasatome können aufgrund ihrer positiven Ladung entgegengesetzt in Richtung Probe beschleunigt werden und sorgen dort für eine Neutralisierung von Aufladungen.



**Abb. 3.1.1.1:** Schematische Darstellung eines ESEM

### 3.1.2 Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

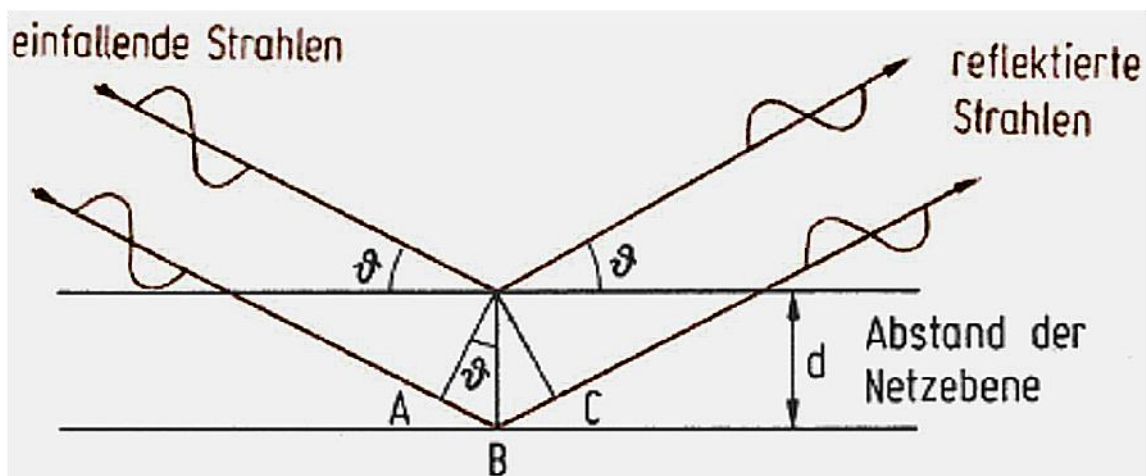
Diese Art der Spektroskopie wird normalerweise während rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen angewandt und beruht darauf, dass hochenergetische elektromagnetische Strahlung jedes Element durch Ionisation zu Emission von Röntgenstrahlung einer spezifischen Wellenlänge anregen kann. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass der auftreffende Elektronenstrahl trotz seiner Fokussierung eine Breite von mehreren Mikrometern hat und es deshalb schwierig ist, einzelne kleine Strukturen auf der Probenoberfläche ohne den Hintergrund zu messen. Oft kommt es bei

aufgeklebten Proben zu hohen Kohlenstoffpeaks aufgrund des Klebepads, außerdem treten bei gesputterten Proben Peaks des aufgedampften Materials wie Gold oder Paladium im EDX-Spektrum auf. Die Intensitäten der Peaks im Spektrum geben Auskunft über die ungefähren Verhältnisse der Elemente zueinander, allerdings werden unterschiedliche Elemente durch Einstrahlung verschiedener Energien unterschiedlich stark angeregt, so dass man für genaue Ergebnisse Kalibrationsmessungen durchführen muss. Raue oder schräge Oberflächen können die Elementverhältnisse durch Streuung ebenfalls negativ beeinflussen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden EDX-Messungen mit einem EDAX Genesis durchgeführt, das ins ESEM Quanta 400 integriert war.

### 3.2 Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD)

Die XRD ist ein Verfahren zur Kristallstrukturaufklärung, bei dem Röntgenstrahlung mit einem Feststoff wechselwirkt. Es wird hochenergetische Röntgenstrahlung verwendet, da deren kurze Wellenlänge im Nanometerbereich ungefähr den Atomabständen im Kristallgitter entspricht und die Strahlung somit nicht komplett von der Oberfläche reflektiert wird, sondern in das Material eindringen kann.



**Abb. 3.2.1:** Streuung der Röntgenstrahlung an parallelen Netzebenen im Kristall, Bild entnommen aus<sup>[34]</sup>; Einfallswinkel=Ausfallswinkel= $\vartheta$ ; der untere Strahl legt einen längeren Weg zurück, den sogenannte Gangunterschied.

Der Abstand paralleler Netzebenen wird über die Bragg'sche Gleichung bestimmt:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta$$

Mit  $n$  als ganzzahliger Beugungsordnung,  $\lambda$  als Wellenlänge der eingestrahlten Röntgenstrahlung,  $d$  als Abstand der Netzebenen und  $\theta$  als gemessenem Beugungswinkel kann diese Gleichung nach  $d$  umgestellt werden, um den Netzebenenabstand zu berechnen.

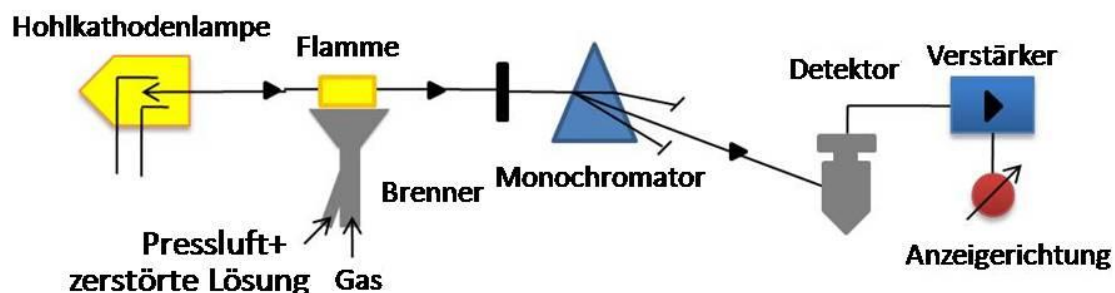
Genauer betrachtet regen im Kristall die Röntgenquanten der sogenannten Primärstrahlung die Elektronen der Probenatome zu harmonischen Schwingungen an. Diese Atome senden daraufhin eine Sekundärstrahlung mit der Frequenz der anregenden Strahlung aus. Aufgrund des regelmäßigen periodischen Aufbaus von Kristallen kommt es neben destruktiver auch zu konstruktiver Interferenz mit der von benachbarten Atomen ausgehenden Strahlung. In bestimmten Richtungen liegt Verstärkung der emittierten Wellenfronten vor (Beugungsmaxima), in anderen Auslöschung (Beugungsminima). Aus dem gemessenen Bild kann die Kristallstruktur des untersuchten Probenbereichs ermittelt werden.

Die Untersuchungen können zerstörungsfrei durchgeführt werden, sofern die Probe keinen Schaden durch Röntgenstrahlung nimmt.

### 3.3 Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)

Die Grundlage der Atomabsorptionsspektroskopie<sup>[35]</sup> ist die Fähigkeit von Atomen, im Grundzustand elektromagnetische Strahlung ganz bestimmter Wellenlänge zu absorbieren und dadurch in einen angeregten Zustand überzugehen. Zur analytischen Nutzung dieses Prinzips werden bei der AAS die Atome meist durch thermische Spaltung der entsprechenden Verbindung erzeugt. Zwei wichtige Techniken sind zum einen die F-AAS (Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie, auch Flammen-Technik genannt) und zum anderen die GF-AAS (*Graphite Furnace*-AAS; auch Graphitrohr-Technik genannt). Das für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit verwendete Gerät (Thermo Electron Corporation; M Series AA Spectrometer) gehörte zur Gruppe der GF-AAS.

Die Grundlage der F-AAS bildet die Tatsache, dass ein durch ein angeregtes Atom emittiertes Lichtquant von einem nicht angeregten Atom des gleichen Elements absorbiert werden kann. Zuerst wird die Analysenprobe verdampft und der Dampf dann durch das Licht des zu bestimmenden Elementes geleitet. Die messbare Extinktion, der Intensitätsverlust des Lichts, ist entsprechend dem Lambert-Beerschen Gesetz proportional zur Konzentration der freien Teilchen und damit der Konzentration des Elementes in der zerstäubten Lösung.



**Abb. 3.3.1:** Schematischer Aufbau eines Atomabsorptionsspektrometers

Zur Bestimmung benutzt man ein Absorptions-Flammenphotometer, das aus einer monochromatischen Lichtquelle, einem Brenner mit Zerstäuber, einem

Monochromator oder Filter, einem Detektor und einer Anzeigevorrichtung besteht. Als Brenngase können Gemische aus Luft mit  $H_2$ /Propan/Butan/Acetylen bzw. aus  $N_2O$ /Acetylen genutzt werden. Heutzutage kann man relativ schnell mit automatisierbaren AAS Spuren fast aller metallischen Elemente quantitativ erfassen.

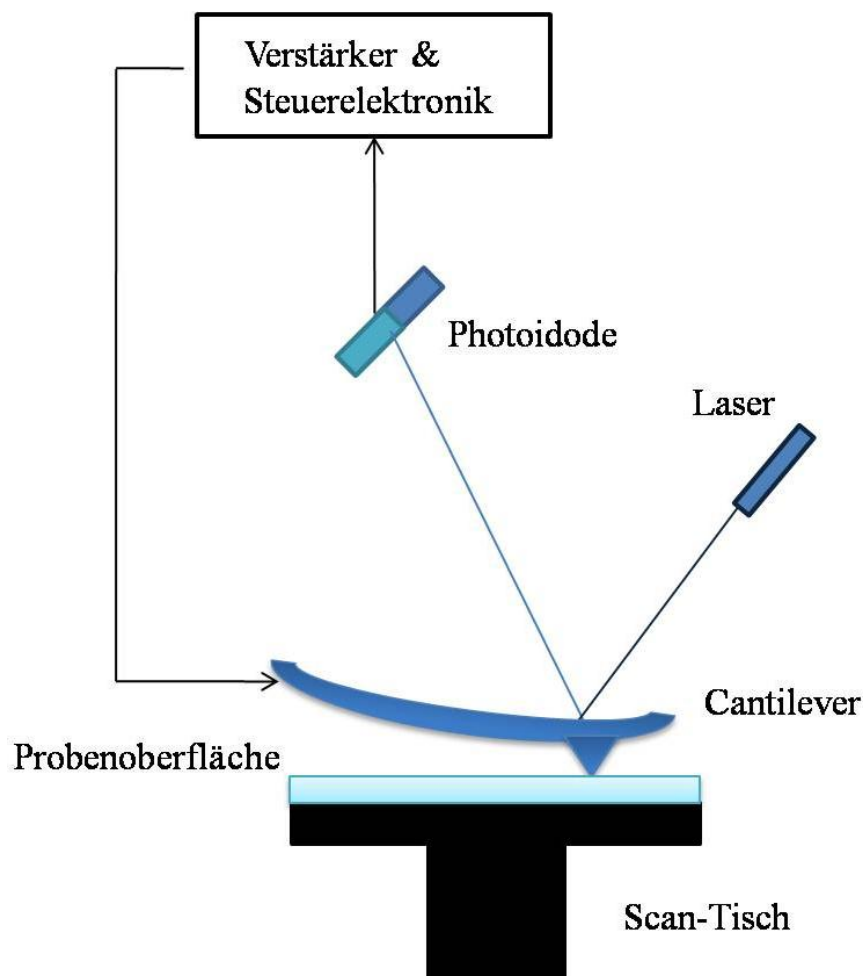
Bei der Graphitrohr-AAS macht man sich dem Umstand zu nutze, dass die Kohlenstoffmodifikation Graphit elektrischen Strom leitet und sich beim Anlegen einer Spannung durch seinen elektrischen Widerstand erhitzt. Bei der Bestimmung direkt aus der festen Probe sollte diese vor der Analyse möglichst wenig vorbehandelt werden, denn jeder Schritt der Probenvorbereitung erhöht die Gefahr, ein falsches Analysenergebnis zu erhalten. Die instrumentellen Entwicklungen der letzten Jahre schufen die Voraussetzungen für eine erfolgreiche direkte Analytik von Feststoffen mit der Graphitrohr-AAS. Auf dieser Grundlage konnte eine Methodik der Feststoffanalyse entwickelt werden, die ein hohes Maß an Präzision gewährleistet. Der quer geheizte Graphitrohratomisator in Verbindung mit verschiedenen automatisierten Feststoff-Probengebern sowie eine optimierte Software bilden die technische Grundlage für den erfolgreichen Einzug dieser Analystechnik in den modernen Laboralltag.

Praktisch wird zunächst die Probelösung in einen Graphitrohrföfen gebracht und in mehreren Schritten erhitzt. Die Vorgehensweise hängt wesentlich von dem zu analysierenden Element sowie seiner chemischen Umgebung ab. Allgemein kann gesagt werden, dass im querbeheizten Graphitrohrföfen ca. 200 °C geringere Pyrolysetemperaturen und 200 bis 400 °C geringere Atomisierungstemperaturen eingesetzt werden als in einem längsbeheizten Graphitrohrföfen. Hiervon ausgehend sollten Temperaturen und Zeiten so optimiert werden, dass das Messsignal bei minimalem Untergrundsignal eine maximale Signalfläche erhält.



### 3.4 Atomic Force Microscopy (AFM)

Die im Deutschen meist Rasterkraftmikroskopie (*Atomic Force Microscopy* AFM<sup>[36]</sup>) genannte Methode ist eine Mikroskopie- und Spektroskopietechnik, die zur hochauflösenden Darstellung von Festkörperoberflächen eingesetzt wird. Dabei tastet eine sehr feine Spitze, die an einem Federkern montiert ist und dessen Durchbiegung hochauflösend gemessen wird, eine Probenoberfläche ab. Heutige Geräte kommen dabei in den Bereich atomarer Auflösung. Die Wechselwirkung der Spitze mit der Oberfläche ist das Resultat der Wirkung einer Reihe von Kräften wie van-der-Waals, elektrostatischer und sogar chemischer Wechselwirkung. Innerhalb der letzten Jahrzehnte hat sich eine lange Reihe von Sonderformen für spezielle Anwendungen der AFM entwickelt, der grundlegende Aufbau ist in Abb. 3.4.1 dargestellt.



**Abb. 3.4.1:** Schematischer Aufbau eines AFM

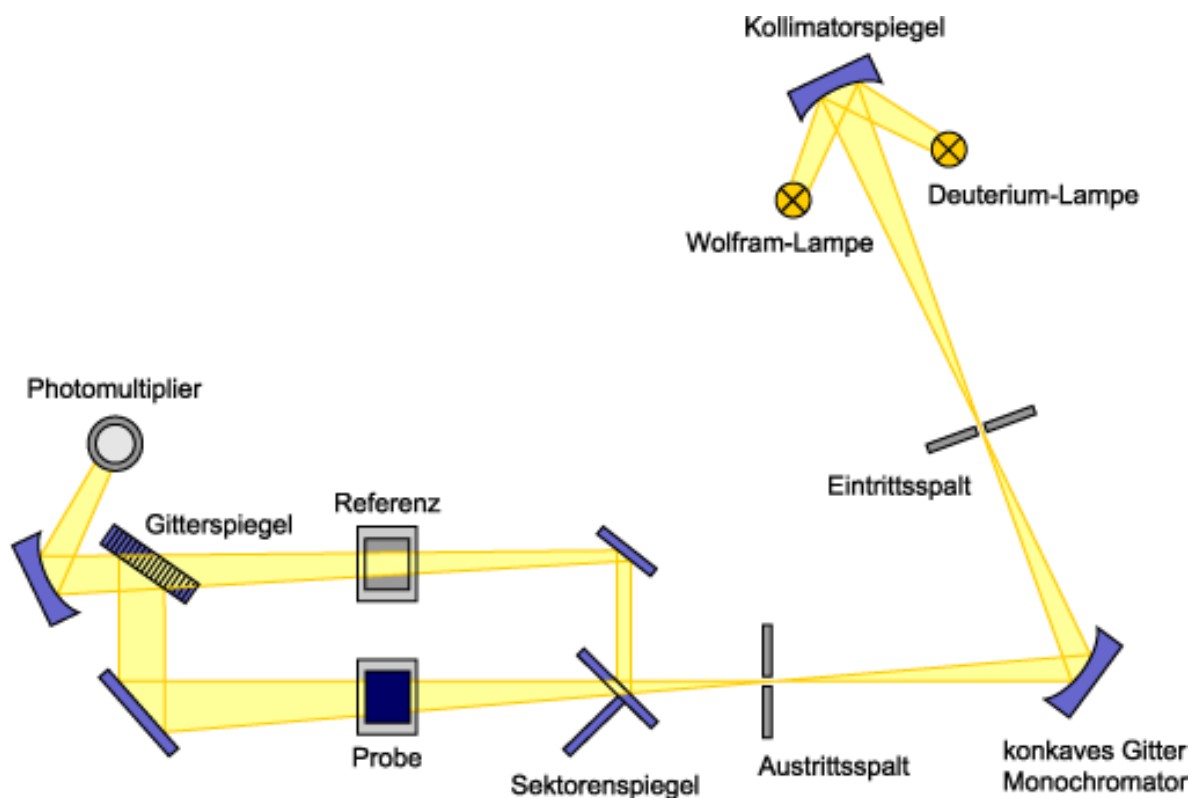
Die sehr feine, nur wenige nm große Spitze wird an einem Befestigungsarm, dem Cantilever, über die zu untersuchende Oberfläche geführt, wobei ein zeilenweises Raster abgefahren wird. Die Geschwindigkeit hängt von der Probenoberfläche ab. Sehr raue Texturen müssen langsamer abgefahren werden als glatte, um eine Kollision der Spitze mit Kanten und Unebenheiten zu vermeiden, was zur Zerstörung der Spitze führen kann.

### 3.5 UV-Vis Spektroskopie zur Phosphatbestimmung

Die UV-Vis Spektroskopie ist seit vielen Jahren eine wichtige Methode der quantitativen Analyse, die aufgrund der geringen benötigten Stoffmengen zur Mikroanalytik zählt. Sie beruht auf der Anregung von Elektronen durch elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich 200-400 nm (ultraviolett) und 400-800 nm (visuell sichtbares Licht). Die Intensität  $I_0$  des durch eine Probe gestrahlten Lichts wird abhängig von der Konzentration  $c$  des absorbierenden Stoffes und der Schichtdicke  $d$  auf die Intensität  $I$  reduziert, was durch das Lambert-Beersche Gesetz ausgedrückt wird:

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d$$

Dabei ist  $\varepsilon_\lambda$  der molare dekadische Extinktionskoeffizient, der für jeden Stoff spezifisch ist, und von der Wellenlänge  $\lambda$  sowie anderen Faktoren wie dem pH-Wert und dem Lösungsmittel abhängt.

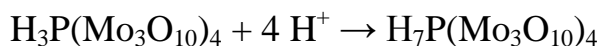
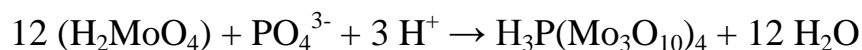
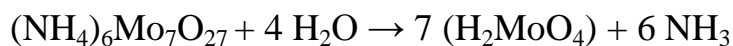


**Abb. 3.5.1:** schematischer Aufbau eines UV-Vis Spektrometers<sup>[35]</sup>

Zur Messung muss die Strahlung je nach Wellenlänge in einer Deuterium- oder Wolframlampe erzeugt, fokussiert und zur Probe geleitet werden, wobei auch

die Möglichkeit besteht zeitgleich eine Referenzprobe zu durchstrahlen. Detektiert wird die Strahlung üblicherweise durch Photomultiplier, die das UV-Vis-Spektrum der gemessenen Substanz abhängig vom durchlaufenen Wellenlängenbereich liefern. Ist man an keinem Spektrum sondern nur der Konzentration eines bestimmten Stoffes interessiert, wird nur die für dessen Anregung spezifische Wellenlänge eingestrahlt und über Kalibriergeraden aus bekannten Proben die gesuchte Stoffkonzentration bestimmt.

Zur Bestimmung von Phosphat in kleinen Konzentrationen wird die Phosphor-Molybdänblau-Methode angewandt<sup>[37]</sup>. Dazu müssen eine schwefelsaure Ammoniummolybdat- und eine Zitronensäure, Natriumpyrosulfit und Metol (4-(Methylamino)phenolsulfat) enthaltende Reduktionslösung angesetzt werden. Durch den niedrigen pH-Wert deutlich unter 1 reagiert das eingesetzte Ammoniumheptamolybdat zu Isopolymolybdänsäure. Dieses reagiert Antimonkatalysiert mit Phosphationen zu Phosphormolybdänsäure. Zur Empfindlichkeitssteigerung wird die Phosphormolybdänsäure zum Phosphormolybdänblau reduziert.



Nach der Zugabe der Reduktionslösung muss man 30 Minuten warten, bis die Reaktion komplett abgeschlossen ist. Längeres Warten über mehrere Stunden muss jedoch auch vermieden werden, da der Farbstoff nicht unbegrenzt stabil ist. Dieser lässt sich schon in kleinen Konzentrationen von wenigen mg L<sup>-1</sup> zuverlässig mittels UV-Vis bei einer Anregungswellenlänge von 725 nm bestimmen. Dazu wird mit einem Phosphatstandard eine Kalibrationsreihe angesetzt, innerhalb deren Konzentrationsgrenzen alle zu messenden Proben liegen sollten, andernfalls ist die Phosphatbestimmung nicht verlässlich.

Ausgeführt wurde die Messung mit einem Varian Cary 1 Bio UV-Vis Photospectrometer mit der Software Varian Win-UV.

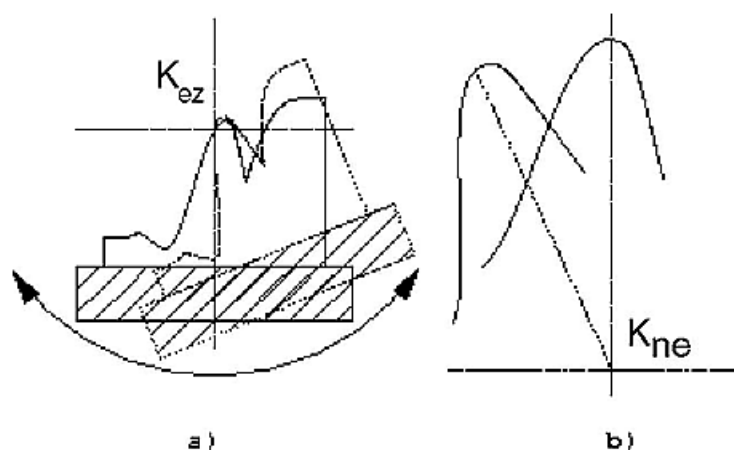
### 3.6 3D-Rekonstruktion von Oberflächen aus zweidimensionalen ESEM-Aufnahmen mittels der Scandium Software

Das Programm Scandium der Firma Olympus Soft Imaging Solutions GmbH gehört zur *analySIS*-Programmfamilie und dient zur Aufnahme, Archivierung und Analyse von Bildern. Es ist möglich diverse Arten von Mikroskopen damit direkt zu steuern, was allerdings im Fall des verwendeten *Environmental Scanning Electron Microscope* aus technischen Gründen nicht möglich war.

Somit wurden nur die implementierten Bildanalyseverfahren eingesetzt, um aus mehreren gegeneinander verkippten zweidimensionalen Bildern einer bestimmten Stelle auf der Probenoberfläche ein dreidimensionales Bild zu konstruieren. Ist dies einmal erreicht, so können mittels der Scandium Software auch weitere interessante Informationen wie z. B. Höhenprofillinien oder durchschnittliche Rauigkeiten bestimmt werden, was auch das Ziel der durchgeführten Arbeiten war.

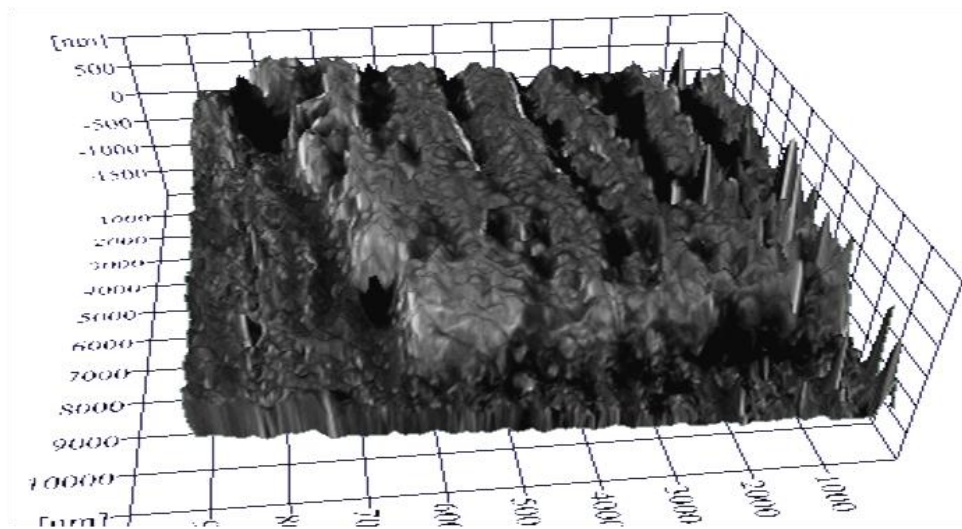
Allerdings ist es problematisch, ein realistisches dreidimensionales Bild zu erhalten, denn es müssen viele Randbedingungen erfüllt werden und nicht in jedem Fall kann ein Erfolg garantiert werden.

Zunächst ist es von entscheidender Bedeutung, den euzentrischen Punkt des verwendeten Mikroskops zu kennen. Dabei handelt es sich um genau die Pro-



**Abb. 3.6.1:** a) Kippung im Fokus am euzentrischen Punkt  $K_{ez}$ , die anvisierte Stelle bewegt sich nicht; b) Kippung an einem nicht euzentrischen Punkt  $K_{ne}$ , die anvisierte Stelle wandert aus dem Fokus

bentischhöhe, bei der bei einer Kippung der fokussierte Probenabschnitt nicht aus dem Bild wandert. Beim verwendeten Mikroskop ESEM Quanta 400 lag dieser bei 11.7 mm, musste aber auf 11.3 mm gesenkt werden (siehe unten). Die Tischhöhe muss also auf genau diesen Wert eingestellt werden, damit bei einer Kippung der Bildausschnitt und vor allem aber die Höhe der Probenoberfläche nicht verändert wurden. Das bedeutet, dass ein Herauswandern des Bildausschnitts in x- oder y-Richtung zwar nicht erwünscht, aber ausgleichbar ist, eine Veränderung der Probenposition auf der z-Achse, also der Höhe, hingegen ein erfolgreiches Arbeiten verhindert. Der Grund dafür liegt in der Methode, die das Programm zur 3D-Rekonstruktion benutzt. Es berechnet aus den Helligkeitsunterschieden aller Pixel zweier oder mehrerer Bilder Informationen über die relative Höhe zueinander und erzeugt so eine dreidimensionale Oberfläche. Deshalb darf zwischen zwei Aufnahmen nicht neu fokussiert werden.



**Abb. 3.6.2:** Beispiel einer 3D-Oberfläche erzeugt mit Scandium 5.0

Im oben gezeigten Beispiel erkennt man deutlich ein aus der Probenebene herausragendes Plateau, das von Gräben durchzogen ist, außerdem einige Fehler am rechten Rand, die ähnlich wie Stalagmiten aus dem Plateau hervorstechen. Es ist häufig so, dass man ein realistisches dreidimensionales Abbild der Probe erhält, dieses aber nicht vollkommen frei von Fehlern ist. Die Konsequenz

daraus ist, dass man die erhaltenen 3D-Oberflächen als eher qualitativ und nicht quantitativ bezeichnen muss.

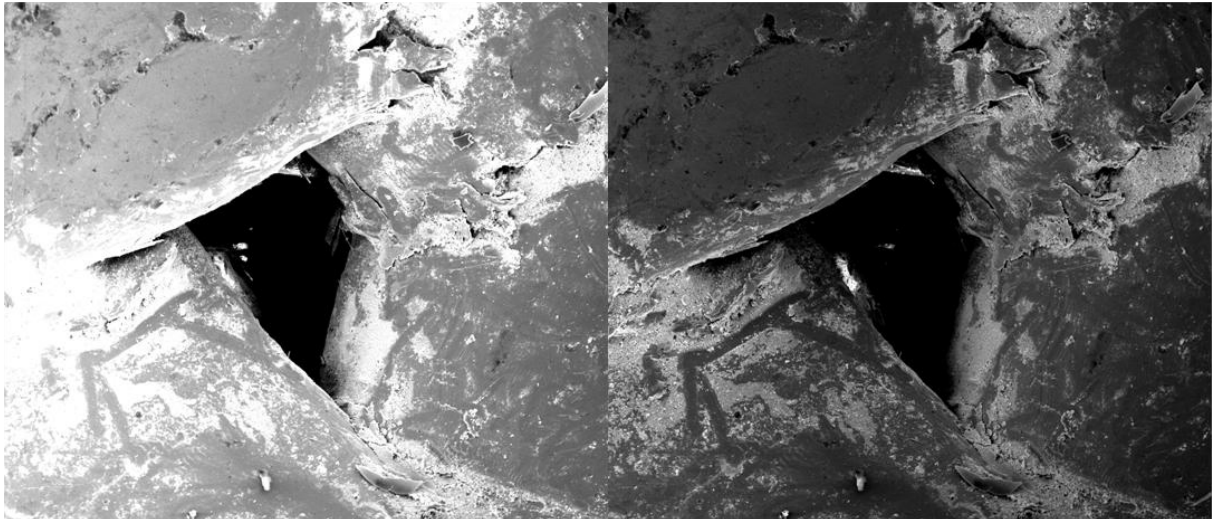
Um ein Ergebnis wie in Abb. 3.6.2 jedoch überhaupt zu erhalten, müssen weitere wichtige Voraussetzungen erfüllt werden. Eine recht triviale ist, dass Scandium nur solche Bilder verarbeiten kann, in denen die Kippachse exakt waagerecht durchs Bild verläuft. Abweichungen um mehrere Grad lassen realistische Ergebnisse nicht mehr zu. Das Programm ist nach Aussage der Herstellerfirma prinzipiell ohne besonderen Grund auf eben diese Kippachse eingestellt. Es ist nur vor der Berechnung nötig eine Grundannahme bzw. Voreinstellung zu setzen, von der das Programm ausgehen kann. Es ist durchaus möglich, auch Bilder mit senkrechter Kippachse zu einer realistischen 3D-Oberfläche umrechnen zu lassen, diese müssen dann nur dementsprechend vorher um  $90^\circ$  gedreht werden. Die Richtung ist dabei unerheblich.

Es empfiehlt sich, von Beginn an eine waagerechte Kippachse anzustreben, was vor allem ein genaues Positionieren der Probe auf dem Probentisch erfordert. Üblicherweise ist die Kippachse nicht auf einem Probentisch eingezeichnet, d. h. man muss sie suchen. Hat man einmal den entsprechenden Punkt gefunden, so sollte man sich dessen Koordinaten notieren oder, falls möglich, sie von der Mikroskopsteuersoftware speichern lassen, so dass man bei späteren Messungen diesen Punkt gezielt wieder anfahren kann.

Desweiteren verfügen viele Mikroskope über mehrere verschiedene Probentische, was bei der Ansteuerung des bereits erwähnten euzentrischen Punktes berücksichtigt werden muss. Außerdem darf die Dicke des Probenhalters und der Probe selbst nicht vernachlässigt werden, weshalb beispielsweise beim im Rahmen dieser Dissertation benutzen ESEM Quanta 400 eine Tischhöhe von ca. 11.3 mm statt der angegebenen 11.7 mm eingestellt werden musste.

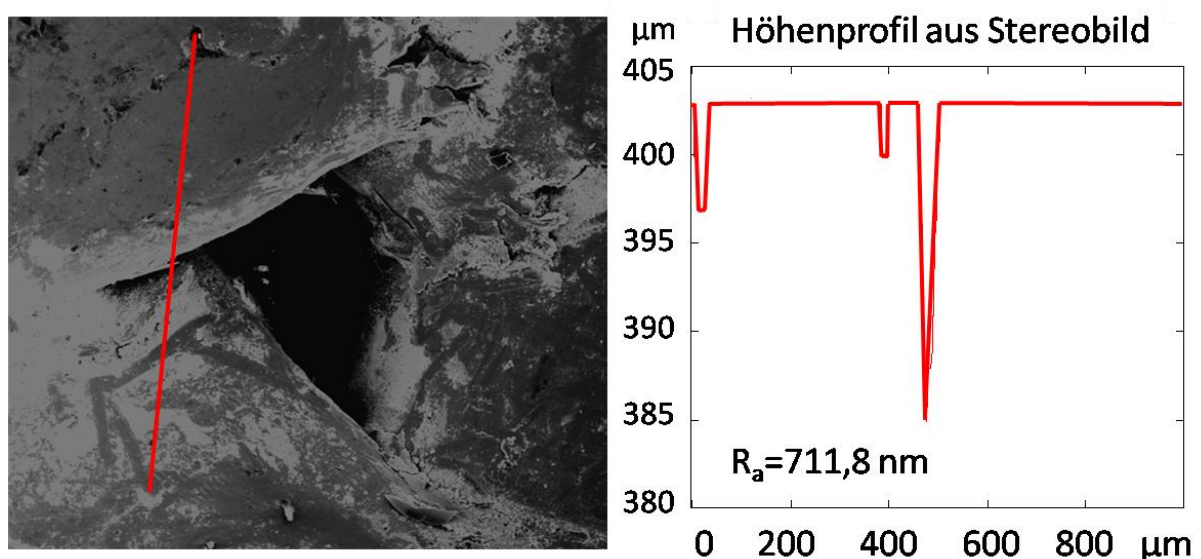
Man hat dann den euzentrischen Punkt erreicht, wenn die Kantenschärfe beim Kippen des Tisches wie in Abb. 3.6.3 nicht verloren geht.





**Abb. 3.6.3:** Bilder um  $+4.7^\circ$  (links) und  $-4.7^\circ$  (rechts) verkippt und trotzdem scharf

Das Beispiel in Abb. 3.6.3 zeigt eine Stelle, die trotz der an diesem Gerät höchstmöglichen beidseitigen Verkipfung um  $4.7^\circ$  keine Unschärfe nach sich zog. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Pixelhelligkeit verändert hat, woraus das Programm letztendlich die 3D-Berechnungen anstellt. Eine Verkipfung um  $2^\circ$  oder  $3^\circ$  ist ebenfalls möglich; es macht jedoch keinen Sinn, Berechnungen anzustellen, solange man nicht den Punkt gefunden hat, an dem ohne neue Fokussierung die Schärfe erhalten bleibt.

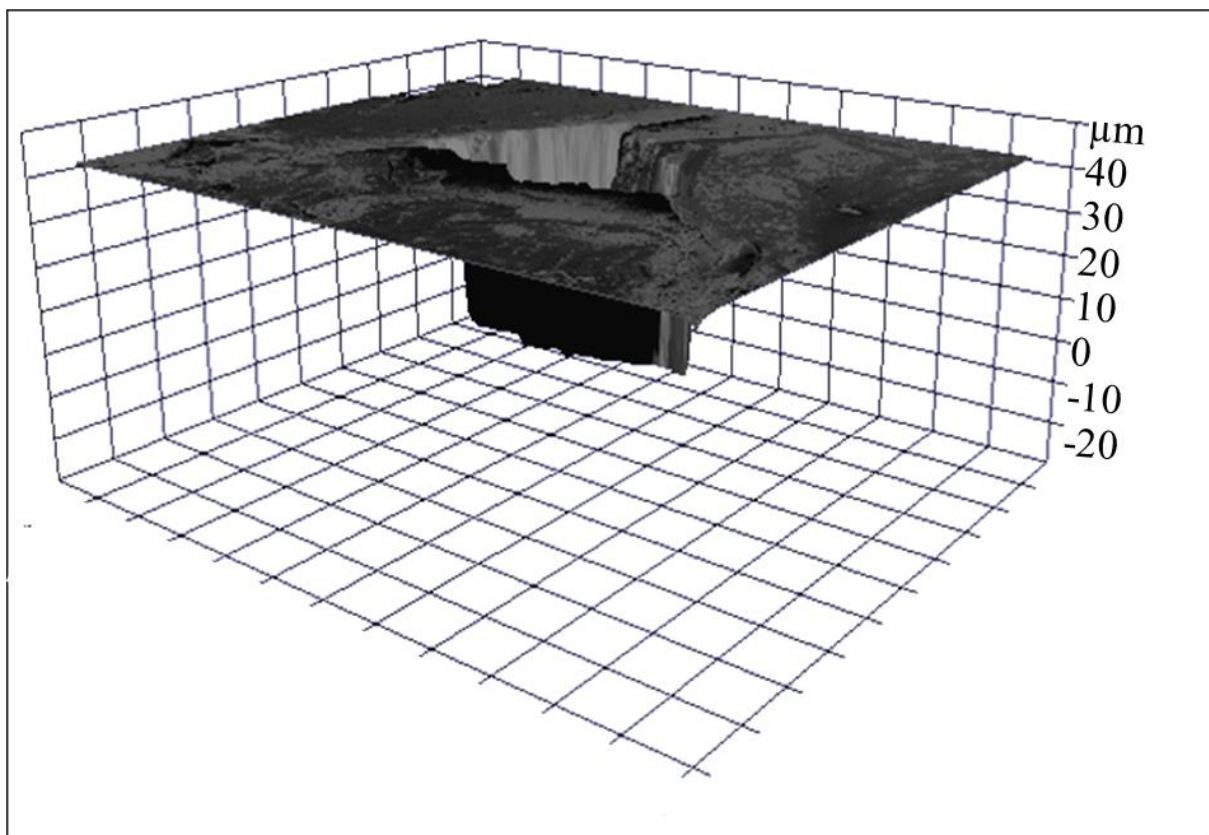


**Abb. 3.6.4:** Stereobild und Höhenprofil der Bilder in Abb. 3.6.3; das Profil wurde entlang der roten Linie links aufgenommen



Prinzipiell ist es möglich, direkt eine 3D-Oberfläche aus zwei dafür geeigneten Bildern wie in Abb. 3.6.3 erstellen zu lassen. Es ist jedoch sinnvoll, zuerst ein Stereobild wie links in Abb. 3.6.4 zu erzeugen, an dem man dann beispielsweise Höhenprofillinien (rechts) erstellen kann. Die dafür durchs Stereobild links von der Mitte von oben nach unten gezogene senkrechte dünne rote Linie ist nur schwer zu erkennen, sie bildet aber die zwei kleinen und eine große Ausbuchtung und deren Tiefe gut erkennbar ab.

Abb. 3.6.5 zeigt die aus dem Stereobild von Abb. 3.6.4 erzeugte 3D-Oberfläche, die Dreidimensionalität lässt sich allerdings naturgemäß auf zweidimensionalen Bildern nur schwer erkennen, beim Rotieren innerhalb des Programms wird sie deutlicher. Sichtbar ist die realistische Darstellung des dreieckigen Lochs in der Mitte sowie der nach außen wegführenden Gräben, über den linken wurde die Höhenprofillinie in Abb. 3.6.4 gelegt.



**Abb. 3.6.5:** 3D-Oberfläche aus Stereobild von Abb. 3.6.4

## 4. Ergebnisse

Das Ergebniskapitel ist in drei eigene Sektionen entsprechend der drei in dieser Dissertation verfolgten Themen unterteilt:

4.1 Synthese von Fluorapatit bestimmter Morphologie

4.2 Behandlung und Untersuchung menschlicher Zähne

4.3 Kapazitätsbestimmungen handelsüblicher Phosphatbinder

Jede Sektion verfügt über eigene Einleitungen, Ergebnisabschnitte, Diskussionen und Zusammenfassungen, das Bindeglied zwischen allen Themen ist dabei das untersuchte bzw. synthetisierte Material: Calciumphosphat und weitere Phosphatverbindungen natürlichen und künstlichen Ursprungs.

### 4.1 Fluorapatit

#### 4.1.1 Einleitung

Bereits vor Beginn dieser Dissertation wurden im Arbeitskreis Epple erste Versuche zur Synthese von Fluorapatit nach der *Constant Composition Methode*<sup>[38]</sup> unternommen. Darüber hinaus wurde das Kristallisationsverhalten des FAP über einen weiten Temperatur- und pH-Bereich charakterisiert<sup>[2]</sup>.

Im Rahmen der darauf aufbauenden Arbeiten sollten nadelförmige Fluorapatitkristalle synthetisiert und wenn möglich funktionalisiert werden, um sie ähnlich parallel wie im Zahnmaterial von Säugetieren und auch Menschen auszurichten (siehe Kapitel 2.1.4).

### 4.1.2 Einfluss verschiedener Versuchsparameter auf die Morphologien von Fluorapatit

Wie in Kapitel 2.1.2 bereits beschrieben treten beim FAP je nach Versuchsbedingungen diverse Morphologien auf.



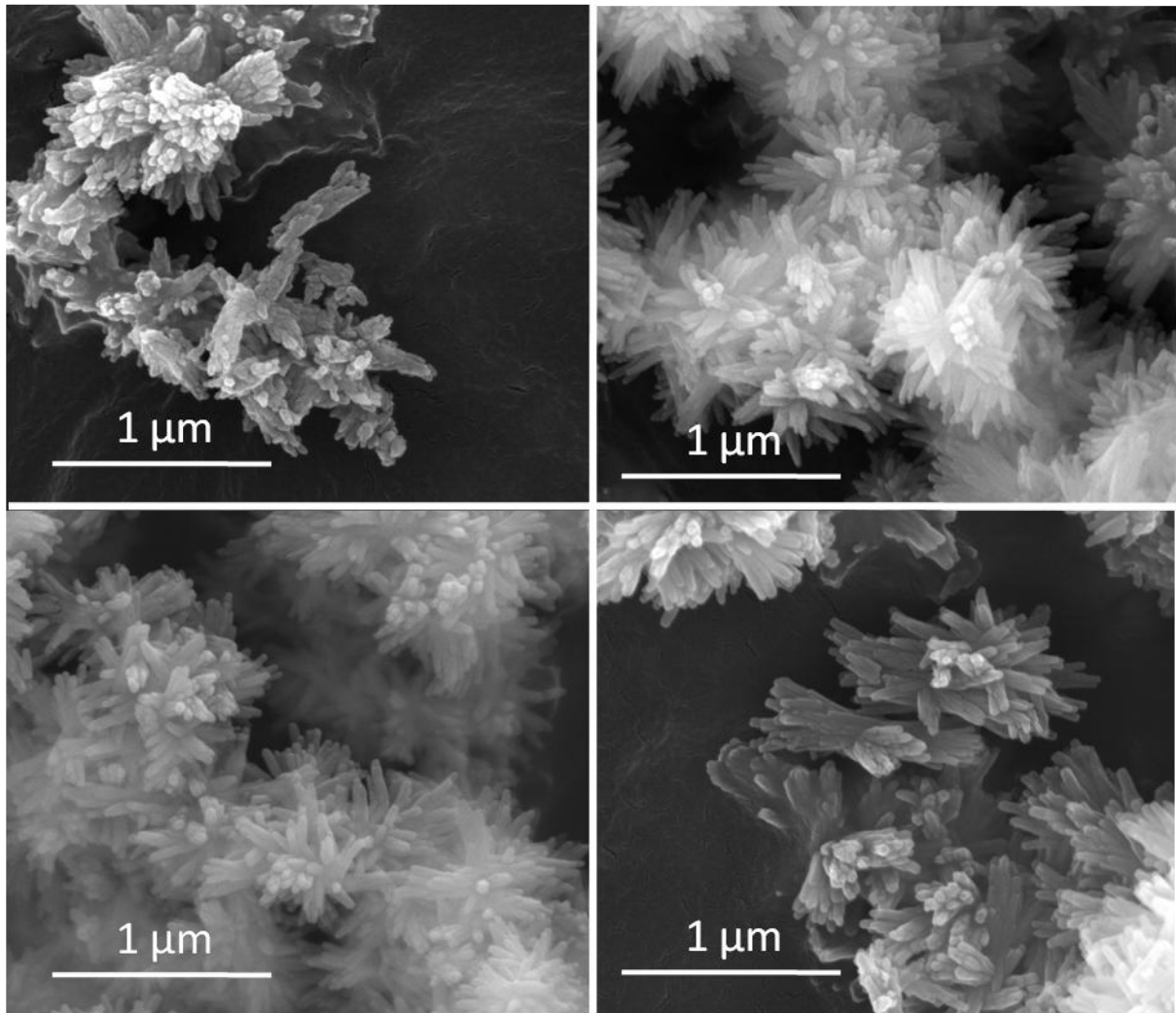
**Abb. 4.1.2.1:** Thermostatisierte und gerührte Bechergläser zur FAP-Fällung

Es wurden die Parameter Temperatur, Versuchszeit, pH-Wert und Ionenkonzentration variiert, zusätzlich wurden verschiedene oberflächenaktive Reagenzien zur Funktionalisierung der Kristallisationsprodukte eingesetzt.

In den oben abgebildeten Behältern konnten jeweils zwei verschiedene Versuche bei gleicher Temperatur durchgeführt werden. Nach Ablauf der vorbestimmten Versuchszeit wurden die kristallinen Produkte mittels eines Büchnertrichters abfiltriert, getrocknet und weiter untersucht.

Da es sich bei Nadeln um eine frühe FAP-Modifikation handelt (siehe S. 12), wurden Versuchsdauern zwischen 5 und 30 Minuten gewählt, da ein späteres Reaktionsende zu weiter fortgeschrittenen Morphologien wie Hanteln oder Kugeln geführt hätte. Es wurden nur bei den Temperaturen 50 und 60 °C Versuche durchgeführt, da aus Vorarbeiten bekannt war, dass bei 40 °C schon teilweise Brushit entsteht und ab 70 °C klobige, nicht nadelförmige FAP-Modifikationen vorherrschen. Ebenso war bekannt, dass nadelförmige Partikel

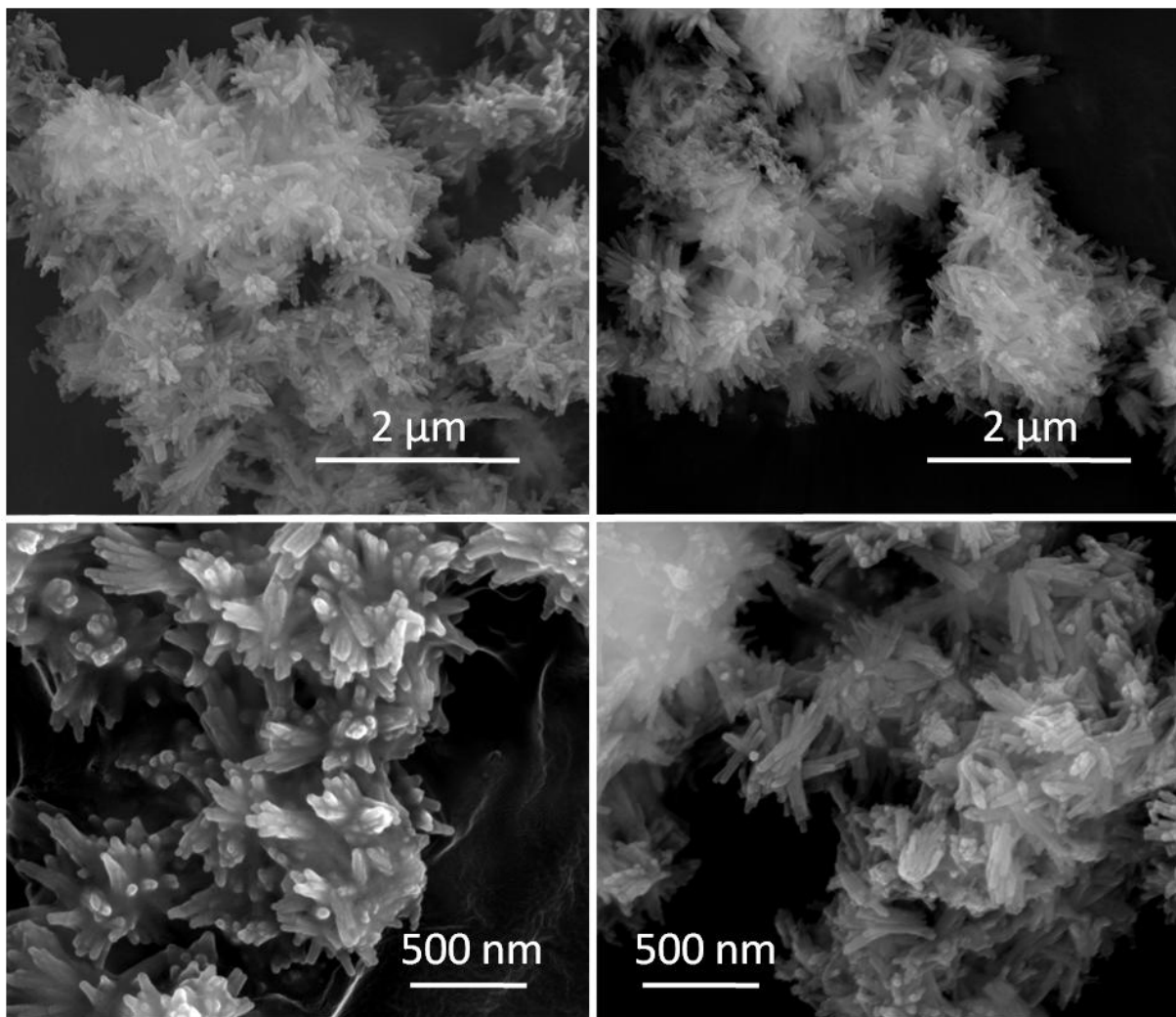
bei pH=6 oder 7 begünstigt entstehen, also wurden diese pH-Werte mit KOH eingestellt. Als Reagenzien wurden Calciumacetat  $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{OO})_2$ , Kaliumdihydrogenphosphat  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und Kaliumfluorid  $\text{KF}$  eingesetzt. Die verwendeten Konzentrationen in mM betrugen für  $\text{Ca}^{2+} : \text{PO}_4^{3-} : \text{F}^-$  entweder 5:3:1, 10:6:2 oder 15:9:3. Oberhalb dieser Konzentrationen liefen die Reaktionen zu schnell ab, um die frühe Morphologie der Nadeln zu erhalten, darunter entstanden entweder diffuse oder gar keine Partikel.



**Abb. 4.1.2.2:** Morphologien bei 10:6:2, pH=6, 50 °C und 5 (links oben), 10 (rechts oben), 20 (links unten) und 30 min (rechts unten) Versuchsdauer

Abb. 4.1.2.2 zeigt eine Beispielserie kurz hintereinander durchgeführter Versuche bei gleicher Konzentration, Temperatur und pH-Wert, nur die Versuchsdauer wurde von 5 bis 30 min variiert. Während nach 5 min (links

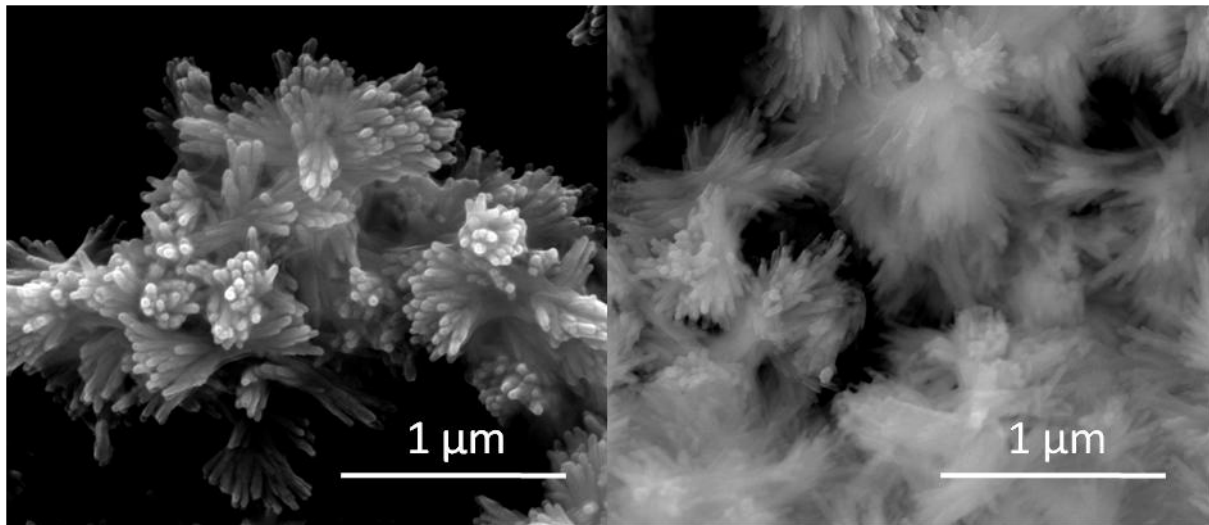
oben) eher unscharfe Partikel unter 100 nm zu sehen sind, werden sie nach 10 min (rechts oben) bereits länger und aggregieren auch stärker als zuvor in die Richtung flauschiger Kugeln. Nach 20 min (links unten) hat sich nicht viel verändert, die Aggregate der länglichen Partikel sehen nur etwas diffuser aus. Nach 30 min (rechts unten) aggregieren die Partikel noch stärker ohne jedoch wesentlich größer zu werden, nur die Aggregate wachsen an. Bei 50 °C, den Konzentrationen 10:6:2 und pH=6 bewegt man sich also nahe am Bereich der nadelförmigen Morphologie, tatsächlich erreicht wird er jedoch nicht.



**Abb. 4.1.2.3:** Morphologien bei 10:6:2, pH=6, 60 °C und 5 (links oben), 10 (rechts oben), 20 (links unten) und 30 min (rechts unten) Versuchsdauer

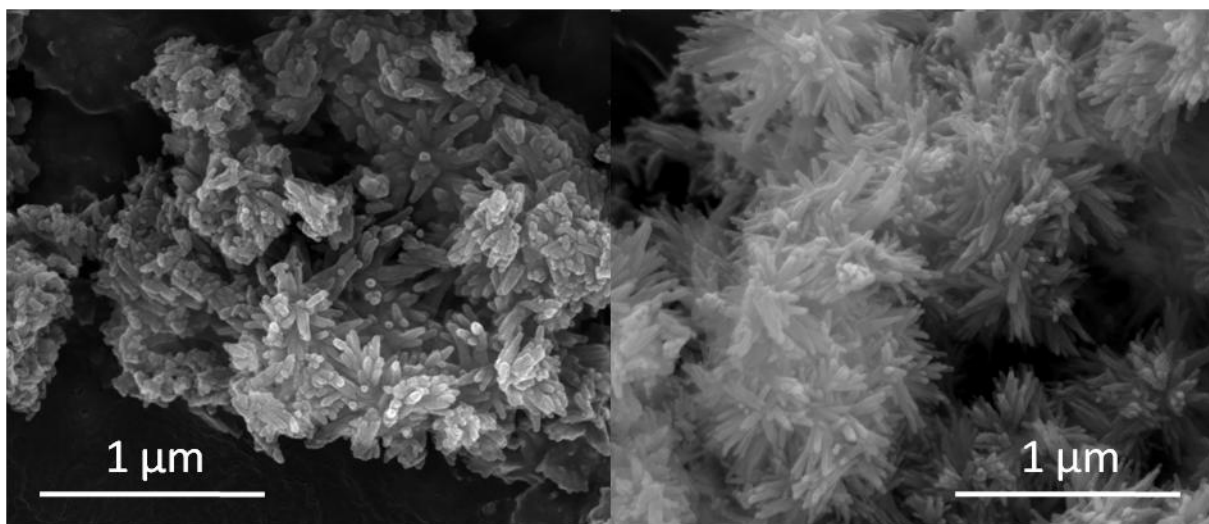
Die exakt gleichen Versuche wie in Abb. 4.1.2.2 mit einer auf 60 °C gesteigerten Temperatur führten allgemein zu dünneren länglicheren Partikeln,

die der Nadelform näher kommen. Nach 20 min jedoch verklebten die Partikel recht stark und auch nach 30 min ist viel Aggregation zu erkennen.



**Abb. 4.1.2.4:** Morphologien bei 5:3:1, pH=6, 60 °C nach 5 (links) und 10 (rechts) min Versuchsdauer

Bei einer Verringerung der Konzentration auf 5:3:1 verklebten die länglichen Partikel noch deutlicher, vor allem nach 10 min (links), noch längere Versuche ergaben noch schlechtere Ergebnisse. Eine Erhöhung des pH-Werts ergab auch keine Verbesserung der Ergebnisse hinsichtlich der Fällung von Nadeln.

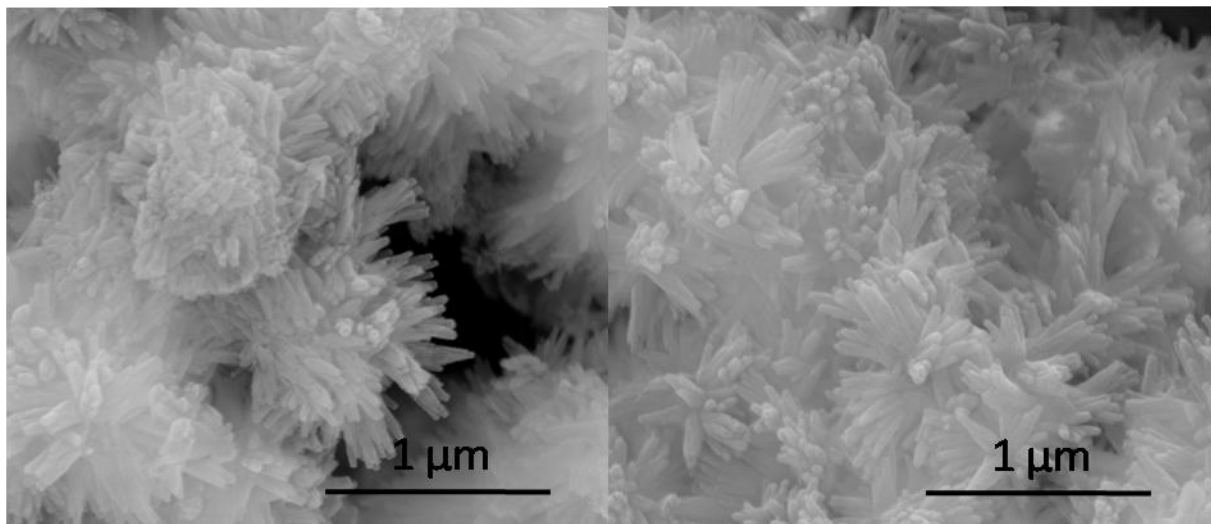


**Abb. 4.1.2.5:** Morphologien bei 5:3:1, pH=7, 50 °C nach 5 (links) und 10 (rechts) min Versuchsdauer; nach 5 min sind die Partikel noch sehr klein, nach 10 zwar länger aber immer an einem Ende zusammengewachsen, freie Nadeln sind nicht zu sehen.



Bei Versuchen zur Funktionalisierung der Kristalle wurden PAH, Poly(allylaminhydrochlorid) (kationisch), PSS, Poly(styrolsulfonat) (anionisch) und PAS, Poly(acrylsäure) (kationisch) eingesetzt. Dabei wurden die Zeitpunkte der Zugabe variiert, sodass die Kristalle ohne Polymer zum Teil nur eine Minute oder bis zu 20 Minuten Zeit hatten sich zu entwickeln.

Leider konnten trotz vieler Versuche keine freien nadelförmigen Partikel erreicht werden, die Polymere inhibierten die Kristallisation entweder vollkommen, oder führten zu klumpigen Strukturen. Bei sehr niedrigen Konzentrationen von  $0.4 \text{ g L}^{-1}$  PAH und  $2 \text{ g L}^{-1}$  PSS waren nur noch geringe Effekte zu beobachten, und wenn es sie gab, entstanden keine Nadeln.



**Abb. 4.1.2.6:** Morphologien bei der Konzentration 10:6:2, pH=7, Temperatur 50 °C, je 20 min Versuchsdauer und  $0.4 \text{ g L}^{-1}$  PAH (links) und  $2 \text{ g L}^{-1}$  PSS (rechts)

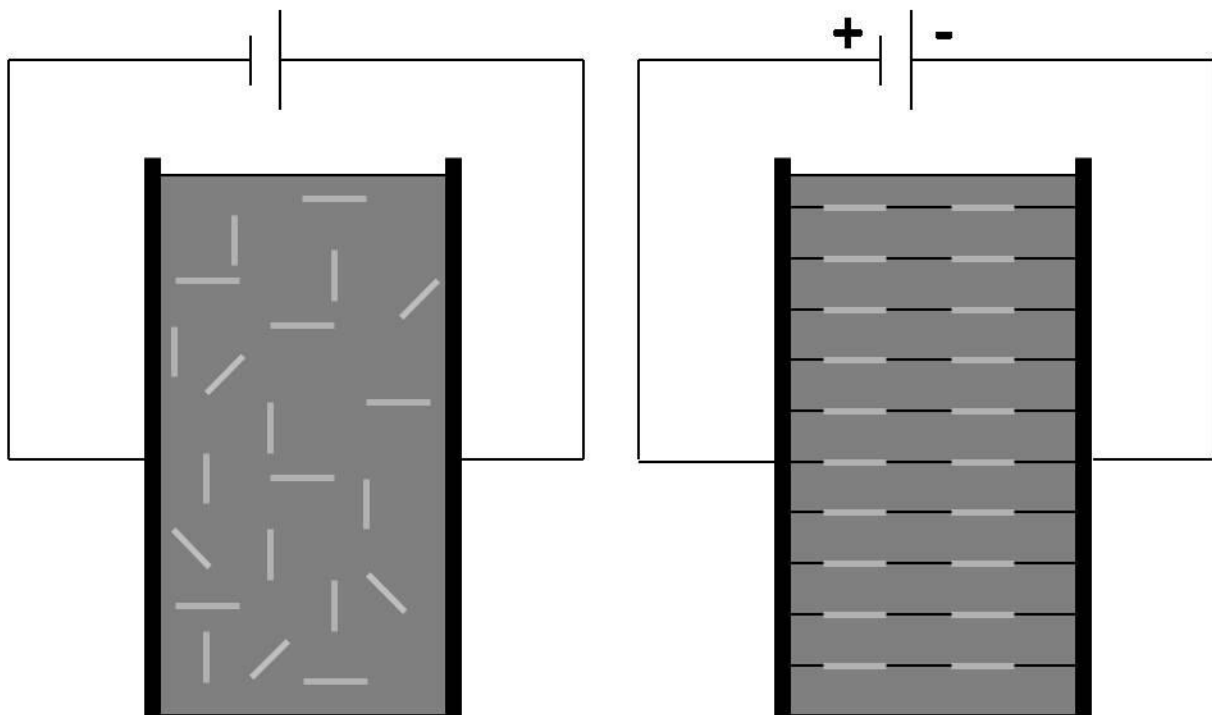
Der Zusatz von  $0.4 \text{ g L}^{-1}$  PAH (links) und  $2 \text{ g L}^{-1}$  PSS (rechts) führte zu länglichen, aber stark aggregierten Partikeln. Der Polymereinsatz führte weder in diesen noch in später durchgeführten Versuchen zu nadelförmigen Teilchen.

Es könnten noch weitere Bilder der über 100 Versuche gezeigt werden, im Endeffekt war jedoch wichtig, dass bei der Ionenkonzentration 10:6:2, einem pH-Wert=6 und der Temperatur von 60 °C nach 10 min die reproduzierbar besten Ergebnisse erzielt und diese Bedingungen weiter verwendet wurden.

### 4.1.3 Ausrichtung von Fluorapatitnadeln im elektrischen Feld

Da die genauen Mechanismen der Aggregation von FAP-Kristalliten zu größeren Einheiten noch nicht abschließend geklärt sind, wurde untersucht, ob elektrische Felder einen Einfluss auf die Ausrichtung frisch gefällter Fluorapatitnadeln nehmen können, da vermutet wird, dass diese ein permanentes Dipolmoment besitzen<sup>[16]</sup>, welches z. B. bei Flüssigkristallen genutzt wird<sup>[39]</sup>.

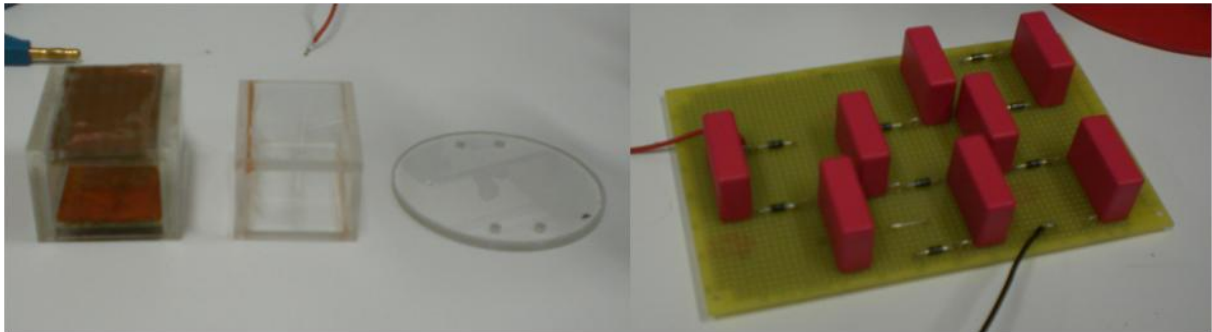
Dazu wurde eine Zelle aus Plexiglas mit einem Volumen von 20 mL hergestellt, als Elektroden wurden Kupferfolien auf die Seiten geklebt und mit den elektrischen Bauteilen zur Spannungserzeugung verlötet. Der Boden der Zelle war eine abnehmbare Glasplatte, die nach Kontaktierung mit Leitsilber im Ganzen in das vorhandene *Environmental Scanning Electron Microscope* eingespannt werden konnte. Dazu wurden an den ESEM-Probenstisch angepasste Löcher durch die Platte gebohrt. In die unteren Enden der Plexiglaswände wurde zu diesem Zweck eine Dichtung eingezogen.



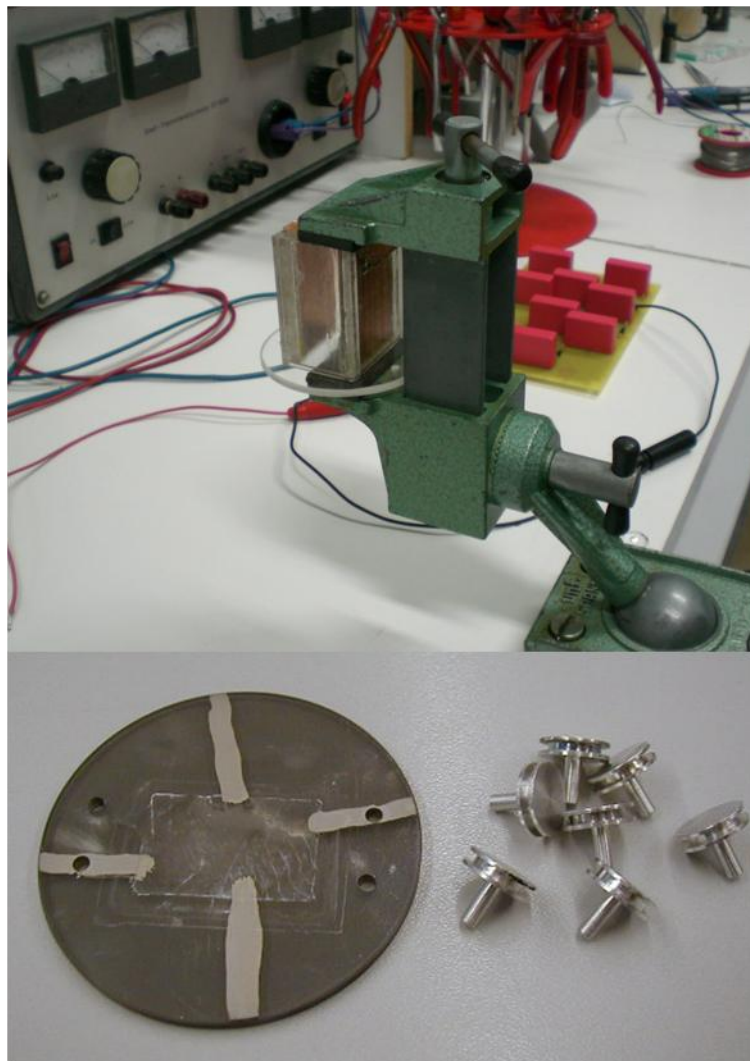
**Abb. 4.1.3.1:** Schematischer Aufbau der Zelle und Theorie der Kristallisation unter Einwirkung elektrischer Felder; links: verteilte nadelförmige Kristalle ohne Feld; rechts: an den Feldlinien ausgerichtete Kristalle



In einen Schraubstock eingespannt war die Zelle so dicht, dass gefahrlos mit hohen Spannungen in der Nähe von Wasser gearbeitet werden konnte.



**Abb. 4.1.3.2:** links: Zellen mit und ohne aufgeklebte Kupferfolie und durchbohrte Grundplatte; rechts: elektrische Bauteile zur Spannungserzeugung



**Abb. 4.1.3.3:** oben: Zelle betriebsbereit; unten: besputterte und mit Leitsilber kontaktierte Grundplatte mit ausgefällten Kristallen und Befestigungen

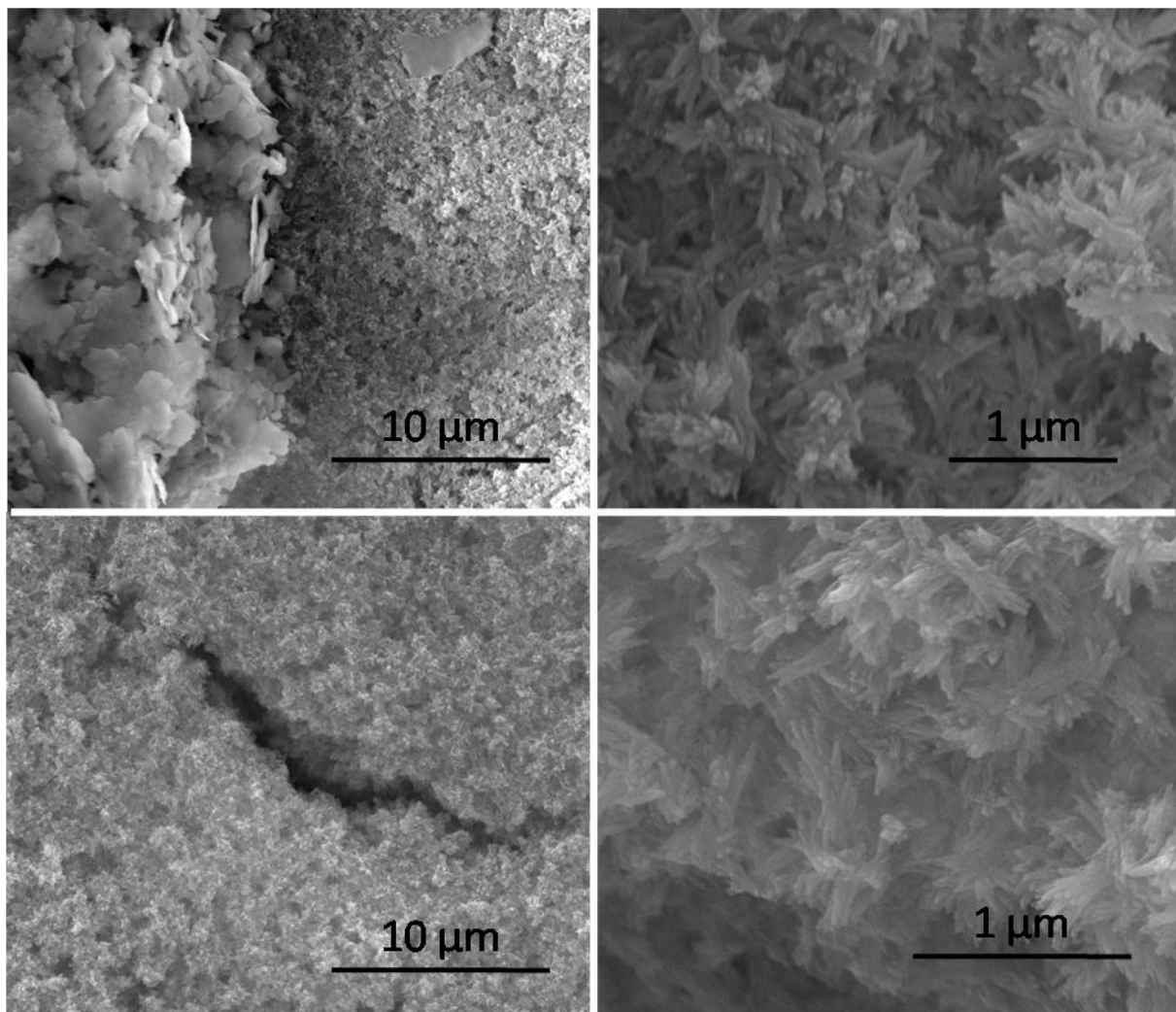
Als Kristallisationsbedingungen wurden die sich zuvor als erfolgversprechend zur Herstellung von Nadeln erwiesene Ionenkonzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}:\text{PO}_4^{3-}:\text{F}^-$  10:6:2 mM bei 50 °C und pH=6 gewählt. Die Zelle wurde jeweils mehrmals mit 63 °C warmen Wasser vorgewärmt, damit sie für den eigentlichen Versuch bei 50 °C die richtige Grundtemperatur hatte. Dann wurden die ebenfalls vorgewärmten Lösungen eingefüllt und kurz gerührt, worauf die Kristallisation automatisch einsetzte.

Ein Problem stellte die Entfernung der Kristallisationslösung beim Versuchsende dar, da die ausgefallenen und zum Boden gesunkenen Kristalle aufwirbelten, wenn man die überstehende Lösung mittels Spritze oder Schlauch absaugte. Durch die geringe Kristallitgröße verursachten schon geringe Strömungen deutlich sichtbare Verwirbelungen, wodurch die möglicherweise zuvor ausgerichteten Kristalle ihre ursprüngliche Lage verloren. Verdampfen der Lösung hätte zu einem starken Konzentrationsanstieg geführt und das Ergebnis beeinträchtigt, daher wurde eine Absaugung der wässrigen Lösung mit Papier realisiert. Ein angefeuchtetes Tuch wurde direkt zu Versuchsbeginn mit in die Zelle und außerhalb in ein Becherglas gehängt, wodurch die Lösung langsam und kontinuierlich durch Kapillarkräfte abgesaugt wurde. Die jeweils eingesetzten 20 mL waren nach einer Stunde komplett entfernt, die zurückgebliebene Feuchtigkeit verschwand durch Trocknung an Luft. Ein Teil der ausgefallenen Kristalle gingen durch die Methode verloren, da sie sich am Papier niederschlugen, doch die einmal zu Boden gesunkenen Kristalle veränderten ihre Lage durch die geringe Sogwirkung des Papiers nicht mehr.

Die in Abb. 4.1.3.3 gezeigten Ergebnisse wurden durch einminütiges Sputtern und anschließendes Kontaktieren des Kristallisationsbereichs mit Leitsilber erreicht. Dadurch war die Leitfähigkeit ausreichend, um rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen erhalten zu können. In größerer Entfernung zu den mit Leitsilber kontaktierten Bereichen kam es dennoch aufgrund der isolierenden

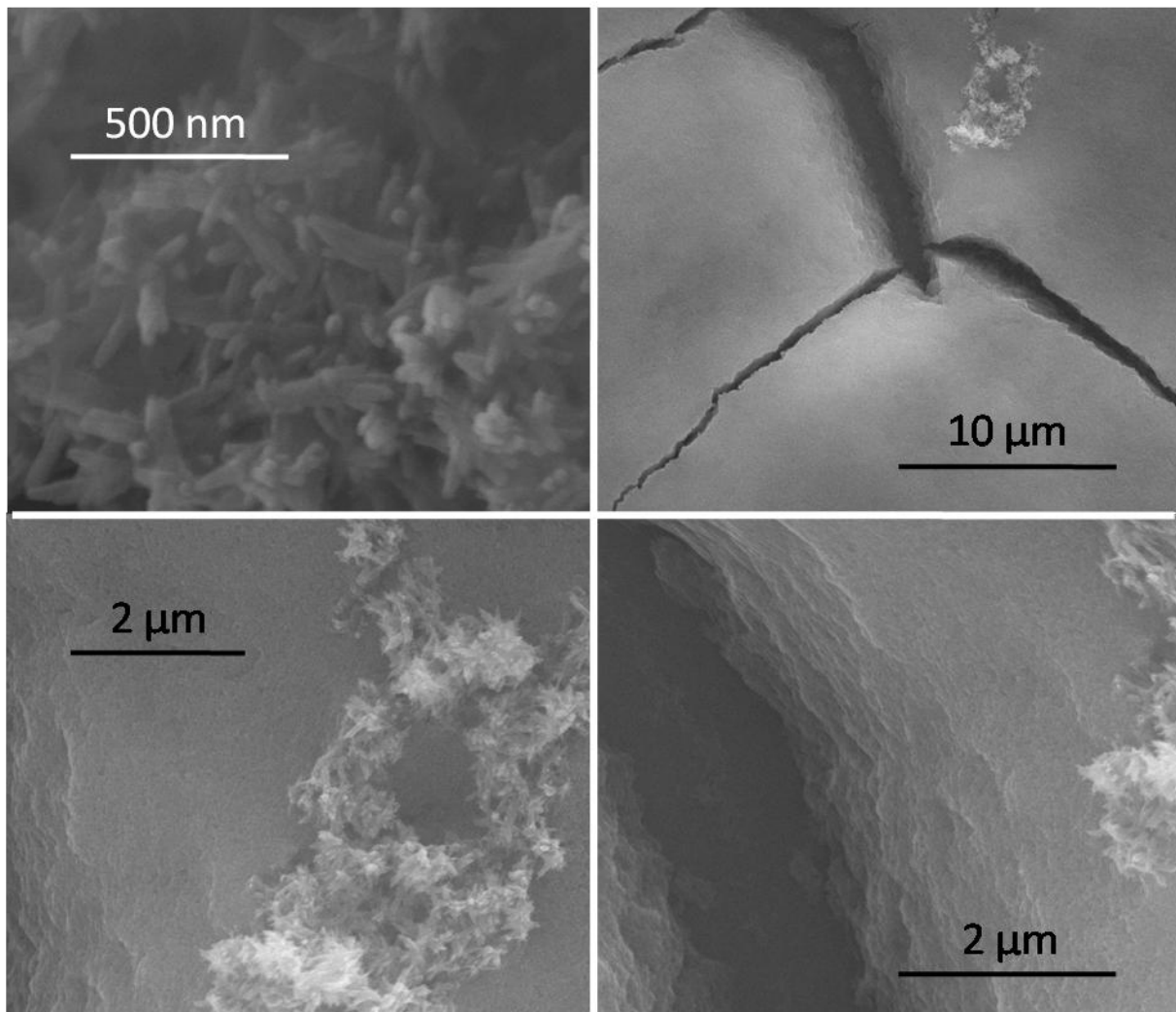
Glasplatte zu Aufladungen, weshalb die Kontaktierung immer weiter ausgeweitet werden musste, indem mehr Leitsilber aufgetragen wurde.

In Abb. 4.1.3.4 sind beispielhafte ESEM-Aufnahmen eines zuvor beschriebenen Versuchs gezeigt. Oben ist ein Bereich am Rand des durch die Zelle vorgegebenen rechteckigen Kristallisationsbereichs (siehe Abb. 4.1.3.3 unten) abgebildet, unten ein mittiger Ort, an dem auch ein Riss in der Kristallschicht durch die Lufttrocknung sichtbar ist. Die Morphologie ist nadelartig gebündelt, und es ist keinerlei Ausrichtung erkennbar.



**Abb. 4.1.3.4:** oben: Rand des Kristallisationsbereichs in der Nähe des Leitsilbers (ganz links); unten: Ort mitten im Kristallisationsbereich mit Trocknungsriß; Vergrößerungen zeigen keine unterschiedlichen Morphologien (rechts)

Die auf der nächsten Seite folgende Abb. 4.1.3.5 stammt von einem weiteren Versuch unter ähnlichen Bedingungen, bei dem in der Nähe des Leitsilbers die höchstaufgelöste Aufnahme im Rahmen dieser Untersuchungen bei einer Vergrößerung von 200.000 aufgenommen werden konnte (oben links). In dieser sind recht feine, wenig miteinander verbundene Nadeln zu sehen, die aber erneut keinerlei Vorzugsrichtung durch eine Feldeinwirkung zeigen. In einem Bereich mit nur dünner Kristallschicht (oben rechts) ist diese eher amorph, und nur vereinzelt sind nadelförmige Kristalle darauf zu erkennen (unten links). Es handelt sich dabei wahrscheinlich um den Bereich unter dem Absaugpapier.



**Abb. 4.1.3.5:** Nahaufnahme der feinen Nadeln (oben links); dünne Stelle mit Riss (oben rechts); Kristalle auf dünner Schicht (unten links); Tiefeneindruck des Risses mit Plattenboden (unten rechts)

Man kann den Mechanismus der Kristallisation an diesen Bildern gut nachvollziehen. Bei der Mischung der Ionenlösung entstehen sofort relativ feine amorphe Partikel, die zu Boden sinken und eine Art Deckschicht bilden. Durch Kristallwachstum innerhalb der Lösung und wahrscheinlich auch auf der Oberfläche werden kristalline Spezies gebildet, die ebenfalls zu Boden sinken und ihrerseits die Deckschicht bedecken, so dass diese nur an besonders dünnen Stellen zu sehen ist, beispielsweise dort, wo ein Papiertuch Kristallite abgefangen hat, die oberhalb des betreffenden Bereichs entstanden waren.

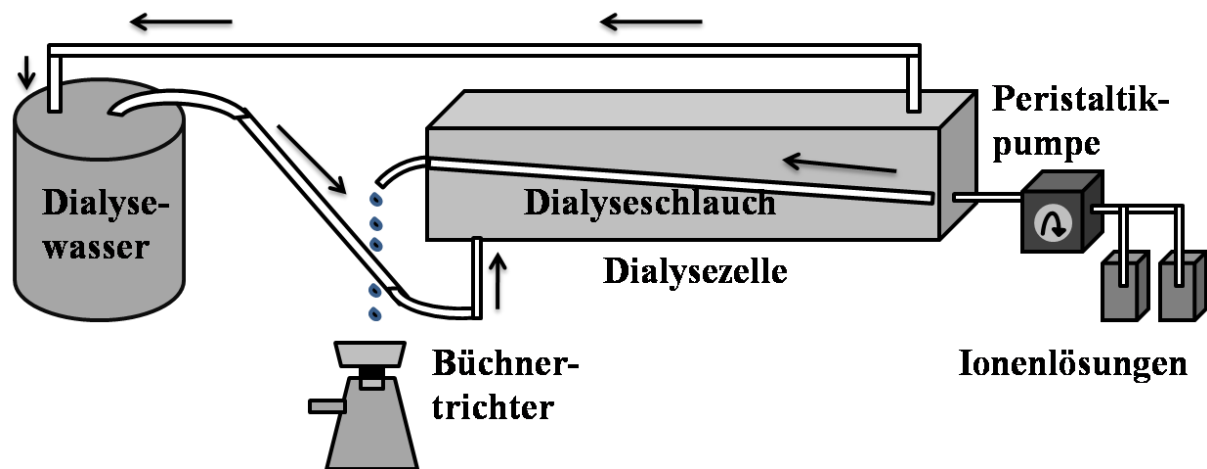
Es können jedoch keinerlei Ausrichtung der entstandenen Nadeln beobachtet werden, obwohl das elektrische Feld (ca.  $30.000 \text{ V m}^{-1}$ ) während der gesamten Versuchs- und der anschließenden Trocknungszeit nicht abgeschaltet wurde. Entweder waren die Dipolwechselwirkungen zu klein für einen sichtbaren Effekt oder die Feldstärke durch die angelegte Spannung war zu gering. Diese konnte allerdings im verwendeten Aufbau nicht beliebig weit erhöht werden, da sonst das Risiko von Kurzschlüssen und damit verbundenen Unfällen zu groß geworden wäre.

Einflüsse von elektrischen Feldern auf die Kristallisation werden schon seit langem diskutiert<sup>[40,41]</sup> und Kniep et al<sup>[16]</sup> fanden auch schärfer geschnittene, aber langsamer wachsende Fluorapatitpartikel unter Einwirkung eines elektrischen Feldes. Allerdings wurde diese Untersuchung innerhalb einer Gelatine-Matrix<sup>[14,18,19,42]</sup> durchgeführt, welche auch für bestimmte Morphologien verantwortlich gemacht wird, die im Rahmen dieser Dissertation auch in wässriger Lösung hergestellt wurden (siehe Kap. 4.1.2).

Zukünftige Arbeiten nach diesem Ansatz setzen den Bau einer neuen Zelle voraus, die einerseits zur Geringhaltung des Elektrodenabstands möglichst dünn ist und andererseits baulich so konzipiert ist, dass große Spannungen zur Erzeugung hoher Feldstärken gefahrlos angelegt werden können.

#### 4.1.4 Fluorapatitkristallisation unter Dialyse

Zur Entfernung der nicht reagierenden Ionen aus einer Kristallisationslösung wurde eine Anlage entworfen und gebaut, durch die Fluorapatitkristalle in einer ionenfreien Lösung gewonnen werden sollten. Durch diese Maßnahme wäre es möglich, die Kristalle in eine Sprühtrocknungsanlage zu leiten und die Lösung zu verdampfen, ohne dass die in Lösung verbliebenen Ionen feste Rückstände gebildet hätten.



**Abb. 4.1.4.1:** Schematische Darstellung der Dialyseanlage

Der zentrale Teil der Anlage war die rechteckige mit Schrauben und Gummidichtungen verschließbare Dialysezelle aus Plexiglas, in die ein Dialyseschlauch eingespannt und gleichzeitig ein externer Dialysegewässerkreislauf eingerichtet werden konnte. Dieses Reinstwasser wurde in zwei jeweils einen Liter fassenden Gefäßen auf 50 °C thermostatisiert und mit einer handelsüblichen Teichpumpe (Neptun 300-1,5 von Oase Living Water) in einem Kreislauf durch die Dialysezelle gepumpt. Der darin eingespannte Schlauch wurde also permanent umspült, während durch ihn die konzentrierten Ionenlösungen mittels einer Peristaltikpumpe gepumpt wurden. Da sich die Anschlüsse für den Dialyseschlauch diagonal gegenüber lagen, konnte die Ionenlösung aufwärts oder abwärts durch die Dialysezelle gepumpt werden, wodurch Totzonen verhindert wurden, die den Transport der entstandenen Kristalle hätten beeinträchtigen können.



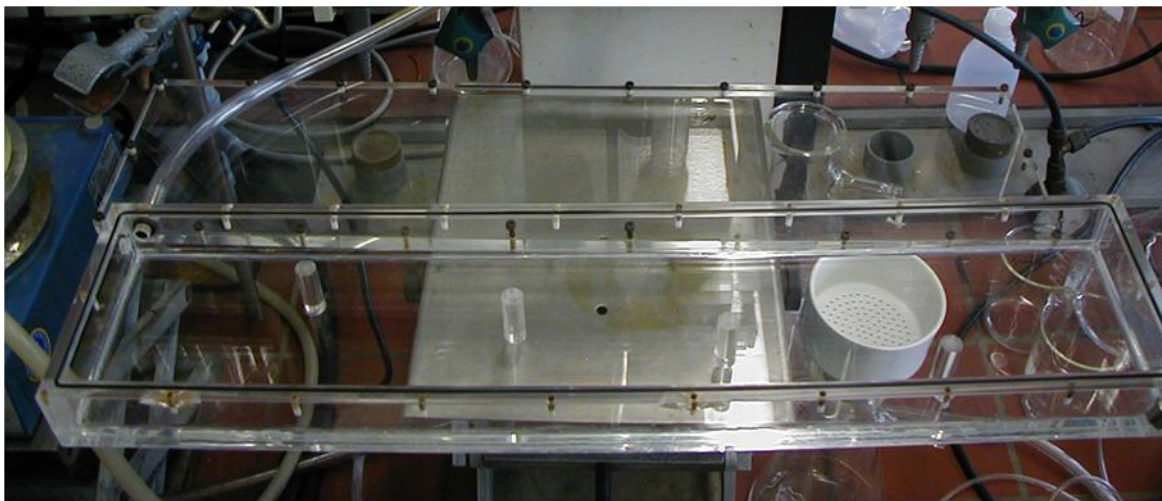


**Abb. 4.1.4.2:** Dialyseanlage; rechts unten Peristaltikpumpe, mittig Dialysezelle mit Dialyseschlauch durch den die Ionenlösungen gepumpt werden; links Wasserreservoirs mit Tauchpumpe, die Dialysewasser transportiert

Außerdem konnten die Pumpgeschwindigkeit und die Ionenkonzentrationen in gewissen Grenzen variiert werden. Optional konnte ein Schlauch vorgeschaltet werden, in dem die Lösungen sich bereits vor Eintritt in die Dialysezelle vermischten und die Reaktion eingeleitet wurde. Die Temperatur der Dialyse- und auch der Ionenlösung sowie deren pH-Wert und die Versuchsdauer waren weitere potenzielle Versuchsvariablen.

Im Reinstwasser reicherten sich während eines Versuchs die durch den Schlauch dialysierten Ionen an, da der gesamte Aufbau jedoch ein Volumen von ca. 4.5 L besaß, konnten dadurch entstandenen Ionenkonzentrationen im Dialysewasser in Bezug auf die Qualität der Dialyse vernachlässigt werden. Da die Konzentrationen inner- und außerhalb des Schlauchs weit auseinander lagen. Durch AAS-Messungen dieser geringen Konzentrationen im Wasser konnten hingegen Rückschlüsse über das Ausmaß der Dialyse gezogen werden, indem man die während des Versuchs durch die Anlage geflossene Ionenmenge mit der

ins Reinstwasser dialysierten Menge verglich. Dieser Vergleich ließ sich am besten mit Kalium anstellen, da dieses als Gegenion des Phosphats, Fluorids und Hydroxids zum Einstellen des pH-Werts in vergleichsweise hoher Konzentration in der Ionenlösung vorhanden war und nicht an der Reaktion teilnahm. Beim ebenfalls bestimmten Calciumwert musste man die durch die Kristallisation verlorene Menge berücksichtigen. Die während des Versuchs ausgefallenen und durch den Schlauch transportierten Kristalle wurden am Auslauf mittels eines Büchnertrichters abfiltriert, getrocknet und anschließend röntgendiffraktometrisch und rasterelektronenmikroskopisch untersucht.



**Abb. 4.1.4.3:** Geöffnete Dialysezelle mit umlaufender Gummidichtung und Schraublöchern im Rand sowie vier runden Plastikhaltern, die einerseits der Zelle als auch dem darüber geführten Schlauch Halt geben.

Die Dialyseschläuche Typ Visking<sup>®</sup> von Serva Electrophoresis GmbH mit einem Innendurchmesser von 6 mm waren nur für einmaligen Gebrauch geeignet und mussten zuvor in 2% Natriumbicarbonatlösung mit 2 mM EDTA (20 g NaHCO<sub>3</sub> + 10 mL 0.1 M EDTA-Lsg. L<sup>-1</sup>) ausgekocht werden, um eventuell anhaftende Ionen zu entfernen. Fette, Verunreinigungen und mechanische Belastung wirkten potenziell zerstörerisch auf die Schläuche, weshalb alle Arbeiten vorsichtig und mit Handschuhen ausgeführt werden mussten. Es wurden vor jedem Versuch 60 cm lange Schlauchstücke abgeschnitten und gegebenenfalls

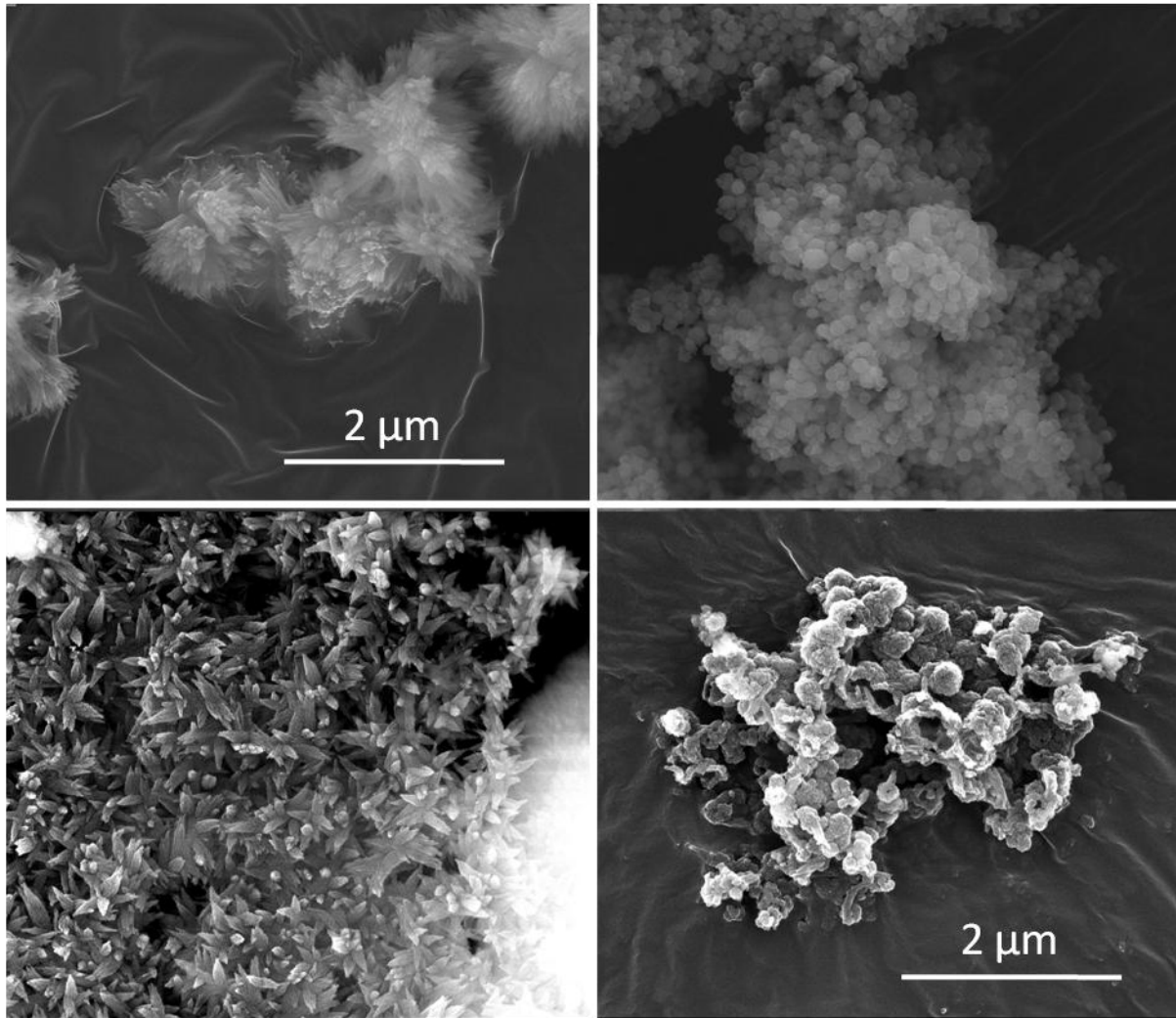


nach dem Auskochen zum Einpassen in die Anlage noch weiter auf die exakte Länge gekürzt, da jeder Knick im Schlauch den Transport der Kristalle behinderte. Die Befestigung war aufgrund der Empfindlichkeit der Schlauchstücke innerhalb der Dialysezelle eine große Herausforderung, da die Metallhülsen an Ein- und Ausgang nur wenig kleiner als der Schlauchinnendurchmesser waren. Dies war jedoch nötig, damit die Schläuche nicht knickten und möglichst dicht gegenüber dem Dialysewasser hielten, was durch die Fixierung mit Gummibändern erreicht wurde. Da jedoch ca. jeder dritte Schlauch nach der Befestigung trotzdem undicht war, wurden jeweils mehrere Schlauchstücke vor jedem Versuch frisch ausgekocht. Undichtigkeiten wurden sichtbar gemacht, indem unmittelbar vor Versuchsbeginn kaltes Reinstwasser durch die befestigten Schläuche gepumpt wurde, dessen Schlieren beim Austritt in die wärmere Dialyselösung bei genauer Beobachtung gut erkannt werden konnten. Gelegentliche erst später aufgetretene Undichtigkeiten führten zu hohem Waschwasserverlust und Verdünnung der Ionenlösungen, so dass diese Versuche abgebrochen wurden.

Es wurden mehr als dreißig Versuche durchgeführt, deren Ergebnisse im Folgenden an einzelnen Beispielen erklärt werden sollen.

Abb. 4.1.4.4 stellt die unterschiedlichen am Ausfluss der Anlage abfiltrierten Morphologien dar, die bei einem Versuch mit den Ionenkonzentrationen von 50:30:10 mM  $\text{Ca}^{2+}:\text{PO}_4^{3-}:\text{F}^-$  und der maximalen Geschwindigkeit der Peristaltikpumpe von  $99 \text{ mL min}^{-1}$ , was einer Verweilzeit im Schlauch von ca. 15 s entspricht, auskristallisiert sind. Man erkennt flauschige Strukturen zu Beginn, nachfolgend kleinere kompakte Kugeln, anschließend spitze verwachsene Nadel- bis Kajakstrukturen und zuletzt größere unregelmäßigere Kugeln, die teilweise hohl wirken. Diese großen Unterschiede sind auf die sich im Versuchsverlauf verändernden Bedingungen im Schlauch zurückzuführen, wobei zuerst die Ionenkonzentration zu nennen ist. Zu Beginn ist der Schlauch noch mit Wasser gefüllt, das sich mit der Ionenlösung vermischt und sie damit

verdünnt. Da das Wasser zuvor bereits aufgewärmt war, ist auch die Temperatur während der Kristallisation zu Beginn höher als am Ende. Außerdem wurden nicht alle Kristalle gleichmäßig ausgetragen und die zurückgebliebenen wirkten als Kristallisationskeime für die nachfolgenden Ionen.

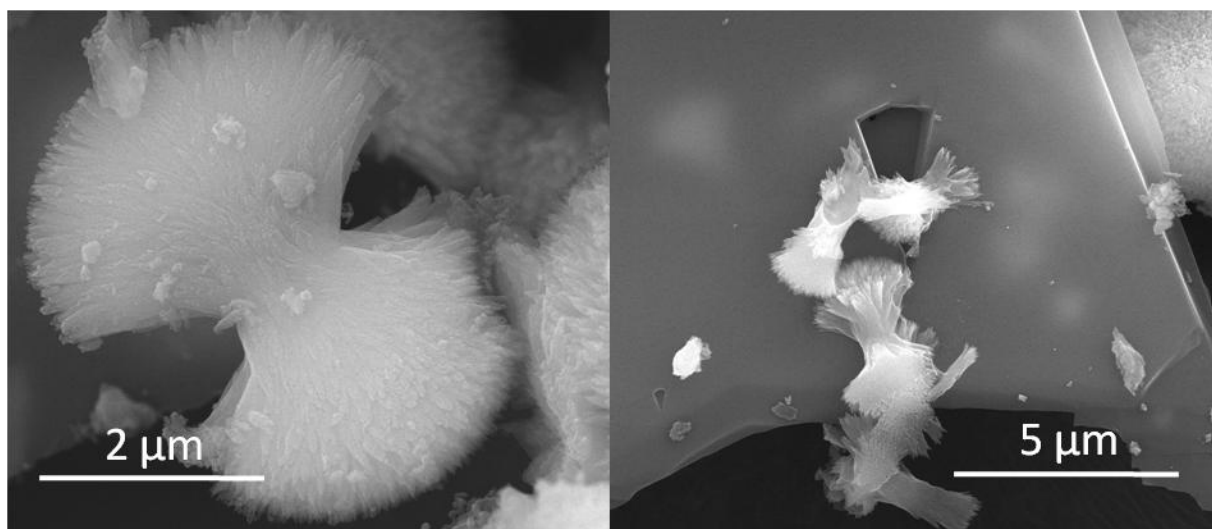


**Abb. 4.1.4.4:** Zeitliche Reihenfolge (von oben links nach unten rechts, jeweils gleiche Vergrößerung) unterschiedlicher Morphologien bei Dialyse ohne pH-Einstellung mit hoher Ionenkonzentration von 50:30:10 mM und Pumpgeschwindigkeit von  $99 \text{ mL min}^{-1}$ , daher schwacher Dialyse

Die hohe Pumpgeschwindigkeit führte zu einer niedrigen Verweilzeit der Lösung im Dialyseschlauch, sodass nur wenige Ionen in das den Schlauch umgebende Reinstwasser diffundierten, was mittels AAS nachgewiesen wurde.

Daher wurde die Pumpgeschwindigkeit schrittweise reduziert, was dann allerdings dazu führte, dass der Druck des die Zelle durchströmenden Dialysewassers den Schlauchinnendruck überstieg und dieser deshalb zusammengedrückt wurde, was wiederum zu einer kürzeren Verweilzeit der Ionenlösung im Schlauch führte. Durch Reduzierung der Pumpgeschwindigkeit des Reinstwassers konnten diese Schwierigkeiten behoben und die Verhältnisse im Verlauf eines Versuchs weiter angeglichen werden. Zudem wurden die Ionenkonzentrationen gesenkt, um dem Ziel einer ionenfreien Lösung im Auslauf näher zu kommen.

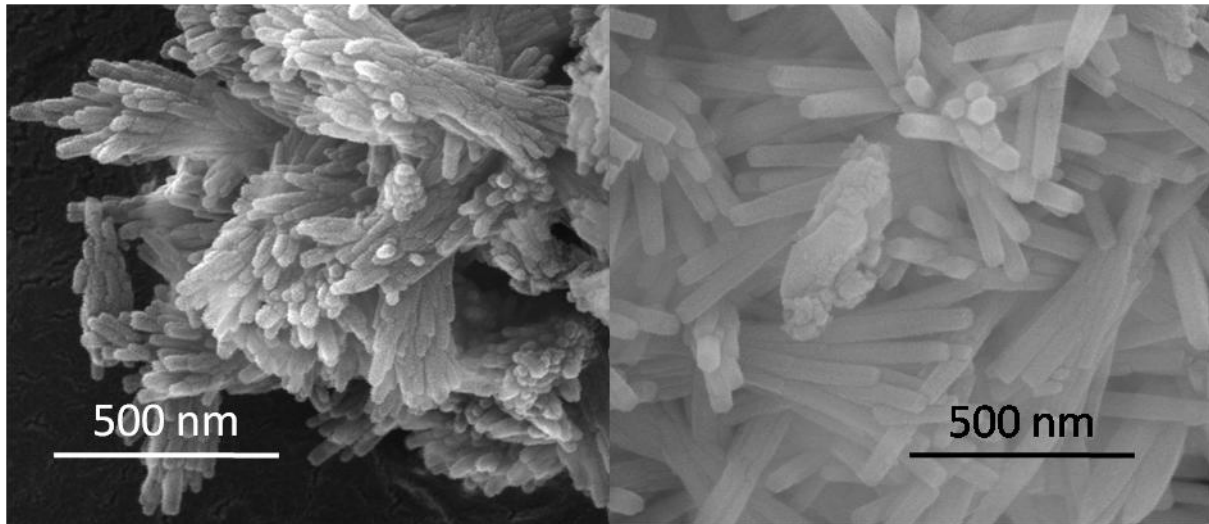
Beim Versuch, dessen Kristalle in Abb. 4.1.4.5 gezeigt sind, betrugen die Konzentrationen 25:15:5 und Peristaltikpumpengeschwindigkeit  $20 \text{ mL min}^{-1}$ , was zu einer theoretischen Verweilzeit von ca. 70 s führte.



**Abb. 4.1.4.5:** In frühen Versuchsstadien auftretende Brushitplatten (rechts) und sich daraus entwickelnde bekannte FAP-Hantel-Morphologien (links) bei der Konzentration 25:15:5 und Pumpgeschwindigkeit  $20 \text{ mL min}^{-1}$

Die gefundenen Morphologien deuten darauf hin, dass die Temperaturen der Lösungen beim Eintritt in die Dialysezelle zu niedrig lagen und deshalb zuerst thermodynamisch instabilere Phase Brushit entstand. Diese wandelte sich bei steigender Temperatur und längerer Kristallisationszeit in Fluorapatit um. Daher wurden bei weiteren Versuchen auch die Ionenlösungen auf  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , die

Temperatur der Waschlösung, erwärmt. Die langsamere Pumpgeschwindigkeit führte zu einer Verringerung der Kaliumkonzentration um 16 % und der Calciumkonzentration um 34 % mit dem Verlust durch Reaktion.

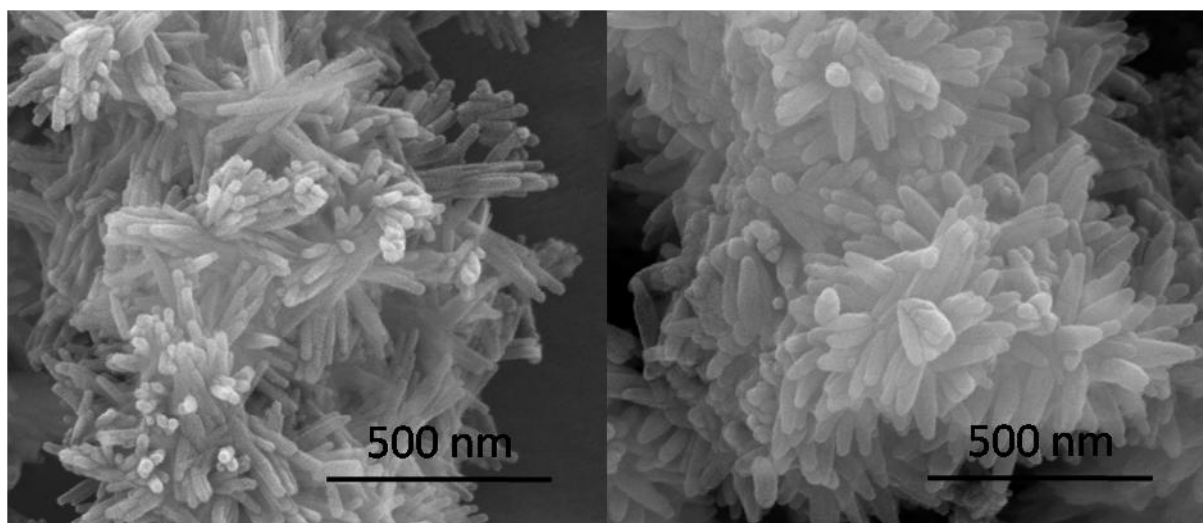


**Abb. 4.1.4.6:** Konzentration 50:30:10, Pumpgeschwindigkeit 20 mL min<sup>-1</sup>, vorgewärmte Lösung

Der erste Effekt des Vorwärmens der Ionenlösungen war eine Steigerung der Produktmenge, es trat aber auch eine Kristallisation bereits im zur besseren Mischung eingesetzten Vorschlauch auf, wodurch Material verloren ging. Die Entstehung von Brushit wurde nicht mehr beobachtet, stattdessen nur noch wenig voneinander abweichende Morphologien, wie in Abb. 4.1.4.6 gezeigt. Links zu Versuchsbeginn entstehen grobe längliche Strukturen, die sich im späteren Versuchsverlauf rechts zu feinen hexagonalen Nadeln entwickeln, die Größenverhältnisse ändern sich jedoch nur geringfügig. Alle aufgenommenen Röntgendiffraktogramme zeigten nur noch Fluorapatit.

Der durch die höhere Temperatur gestiegene Umsatz führt zu einer Entfernung des Calcium aus der Ionenlösung von 84 %, aber auch Kalium wird ohne an der Reaktion teilzunehmen zu 33 % ausgewaschen, die Diffusion durch die Schlauchwand wird also ebenfalls durch das Vorwärmen der Lösungen verbessert.

Um geringere Ionenkonzentrationen im Auslauf zu erreichen, wurden die Eingangskonzentrationen kontinuierlich weiter gesenkt, bei oben gezeigtem Versuch auf 15:9:3. Eine Pumpgeschwindigkeit unter  $20 \text{ mL min}^{-1}$  führte oft zu Problemen mit dem Schlauchinnendruck, der durch das „bergauf“-Führen der Lösungen jedoch erhöht werden konnte. Mit „bergauf“ ist hierbei gemeint, dass die der Dialyseschlauch so in die Zelle eingespannt wurde, dass die Ionenlösung diesen aufwärts durchfloss, wodurch der Schlauch weniger zusammengedrückt wurde. Durch Zugabe von 10 mM KOH und die damit verbundene Erhöhung des pH-Werts wurde die Produktausbeute relativ zur Ausgangskonzentration weiter erhöht und die in Abb. 4.1.4.7 gezeigten Produkte aus der Anfangs- und Endphase (links bzw. rechts) waren recht homogen, es herrschten nadelförmige Modifikationen unterschiedlicher Dicke und ähnlicher Länge vor.

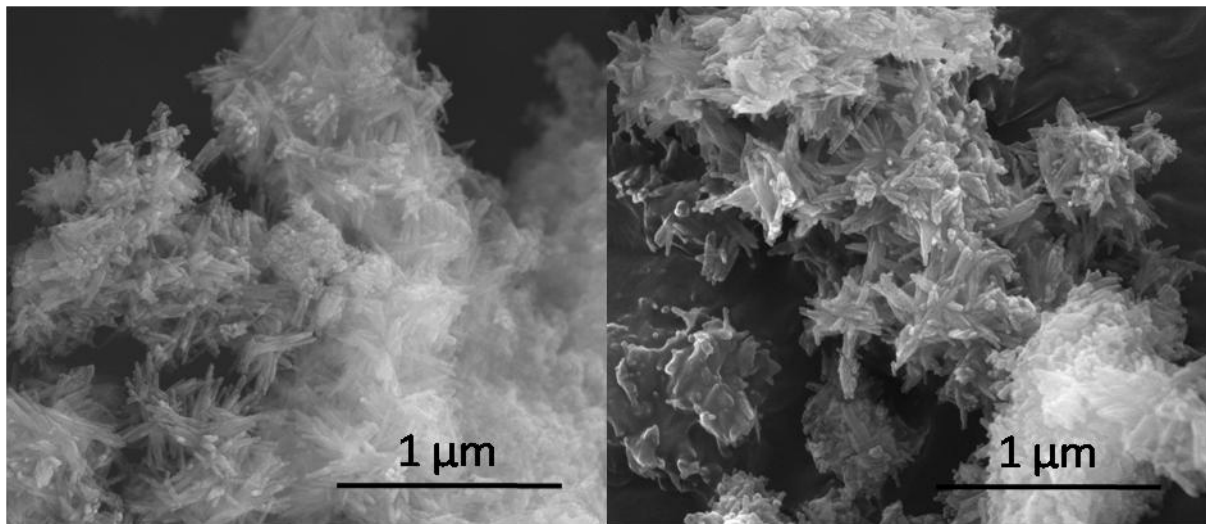


**Abb. 4.1.4.7:** Konzentration 15:9:3, Pumpgeschwindigkeit  $20 \text{ mL min}^{-1}$ , 10 mM KOH zu Anionen gegeben, Schlauch aufwärts

Da bei diesem Versuch nur 13% Kalium aus der Lösung dialysiert wurden, ist der Verlust an Calcium von 70% vor allem auf die Kristallisation zurückzuführen. Eine Erklärung für die schlechtere Dialysewirkung ist das geringere Konzentrationsgefälle zwischen Waschwasser und Ionenlösung, die im Vergleich zu früheren Versuchen nur noch ein Drittel der

Eingangskonzentration betrug. Dadurch bedingt waren zwar absolut weniger Ionen im Auslauf, die Dialyse lief jedoch in geringerem Umfang ab.

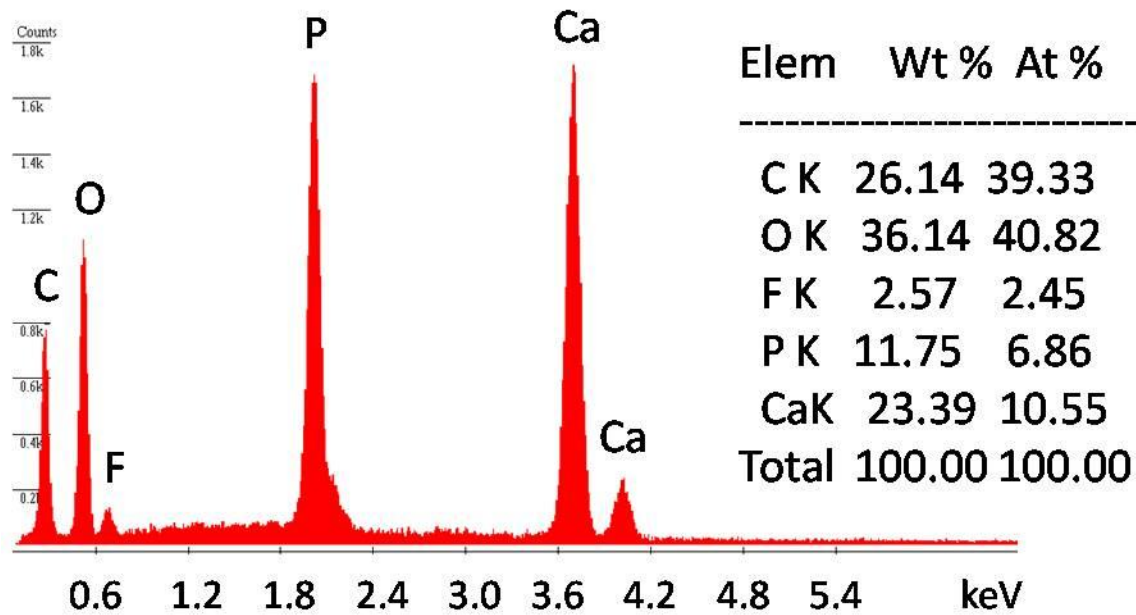
Bei einer weiteren Halbierung der Eingangskonzentration wurde eine kaum noch messbare Dialysewirkung gefunden und auch die Morphologien entfernten sich langsam von der angestrebten Nadelform. Im Versuchsverlauf sank der Calciumgehalt der Lösung zwar um 80%, dies ist aber wahrscheinlich fast ausschließlich auf die Reaktion zurückzuführen, denn die Kaliumkonzentration an Ein- und Ausgang war nahezu identisch. Im Waschwasser wurden beide Ionen nur in sehr geringen Konzentrationen gefunden ( $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca}$ ,  $5 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}$ ).



**Abb. 4.1.4.8:** Konzentration 7.5:4.5:1.5, Pumpgeschwindigkeit  $20 \text{ mL min}^{-1}$ , 5 mM KOH

In Verbindung mit weiteren Versuchen lässt sich der Schluss ziehen, dass es beim verwendeten Aufbau unterhalb einer Calciumkonzentration von 10 mM nur noch sehr begrenzt zur Dialyse kam und daher das Ziel einer ionenfreien Lösung nach der Dialysezelle so nicht zu erreichen war. Die Verweilzeiten von ca. 70 s ließen sich ebenfalls nicht durch geringere Pumpgeschwindigkeiten wesentlich verringern, da das Volumen der Dialyseschläuche dann abnahm.

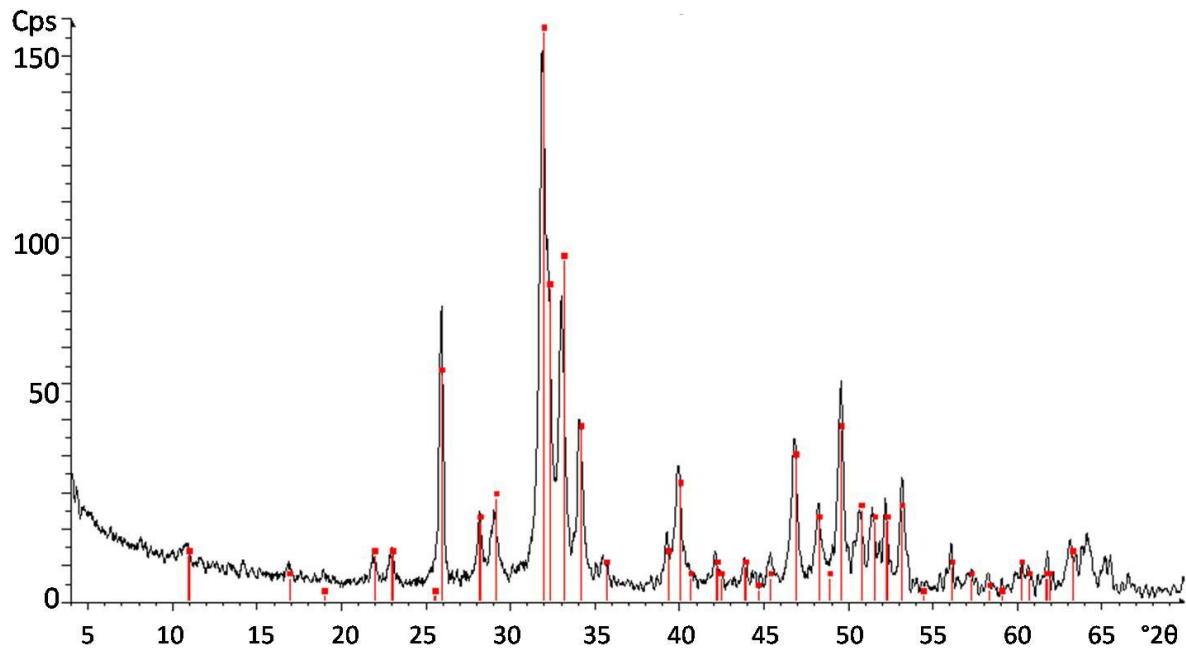
Abb. 4.1.4.9 zeigt ein beispielhaftes EDX-Spektrum der erhaltenen Produkte (hier das aus Abb. 4.1.4.8 links) mit den Gewichts- und Atomprozenten:



**4.1.4.9:** EDX-Spektrum mit Massen- und Atomprozenten des Produkts gefällt bei der Konzentration 7.5:4.5:1.5 und der Pumpgeschwindigkeit 20 mL min<sup>-1</sup> (entspricht Abb. 4.1.4.7 links)

Der Kohlenstoff und der zu hohe Sauerstoffwert rühren vom Klebepad her, mit dem das Kristallpulver auf dem Probenträger fixiert wurde. Es tritt jedoch kein Kalium auf, welches also offenbar nicht mit gefällt wurde. Die Werte von Calcium, Kalium und Fluorid passen mit ungefähr 10 zu 6 zu 2 bemerkenswert gut zusammen, wenn man als Produkt Fluorapatit  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$  annimmt.

Dieses wurde auch in weiteren Röntgendiffraktogrammen nachgewiesen, ein Beispiel ist in Abb. 4.1.4.10 gezeigt. Alle Diffraktogramme ähnelten dem gezeigten, außer von den Produkten, die schon rasterelektronenmikroskopisch erkennbar Brushit enthielten.



**Abb. 4.1.4.10:** Beispielhaftes Röntgendiffraktogramm mit Referenzreflexen von FAP (Produkt von Abb. 4.1.4.6 rechts)

Um dem beschriebenen Problem eines zusammengedrückten Schlauchs bei zu geringer Pumpgeschwindigkeit der Ionenlösungen entgegenzuwirken, wurde versucht, den Schlauch künstlich mit einer langen Drahtfeder aus Edelstahl (Gutekunst Federn Metzingen Norderstedt Cunewald) offen zu halten. Da diese einen Meter lang war, wurde auch gleichzeitig die zurückgelegte Strecke der Ionen und somit die Möglichkeit zur Diffusion erhöht. Aus verschiedenen Gründen konnten dadurch aber keine Erfolge erzielt werden. Zum einen wurden viele der sehr empfindlichen Schläuche perforiert, obwohl die Feder keine wirklich scharfen Kanten aufwies. Die geringen Zugkräfte an den Metallhülsen an Ein- und Ausgang, über die die Schläuche jeweils gestülpt werden mussten, führten zu mehreren Rissen und Waschwasser vermischte sich mit der Ionenlösung. Durch die größere Schlauchlänge musste dieser innerhalb der Dialysezelle um zwei der vier runden Plastikhalter gewickelt werden, wodurch Totzonen in den Kurven entstanden, in denen der Großteil der ausgefallenen Kristalle liegenblieb und somit wenig Produkt im Büchnertrichter ankam. Kleine Knicke im gebogenen Schlauch sorgten für weitere Transporthindernisse für die



Kristalle, teilweise blieben auch größere Luftblasen im Schlauch hängen, was die Dialyseleistung senkte. Diese war allerdings aufgrund der häufig auftretenden Undichtigkeiten schwer zu quantifizieren, da es so zu Verdünnungen kam. Außerdem war der Verlust an ausgefälltem Material weit größer als dessen Ausbeute, sodass die gebundene Calciummenge nur schwer abzuschätzen war. Die erhaltenen Kristallmengen bewegten sich im Bereich von 0.1 g oder darunter. Beim Kalium kam es teilweise zu Reduktionen der Konzentration bis zu 50%, was allerdings zum Teil auf eben genannte Effekte zurückzuführen sein dürfte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Lösung, in der ausschließlich Kristalle und keine Ionen mehr zu finden waren mit dem verwendeten Aufbau nicht hergestellt werden konnte. Hohe Ionenkonzentrationen führten zu hoher Dialyse, nicht dialysierte Ionen verließen die Anlage jedoch mit den Kristallen zusammen. Die Konzentration am Ausgang konnte bei einer geringeren Eingangskonzentration zwar reduziert, aber nicht auf null gebracht werden, da die Dialyse bei kleinen Konzentrationen und dadurch bedingtem geringem Konzentrationsgefälle zwischen Ionenlösung und Waschwasser nur noch unvollständig funktionierte. Eine höhere Verweilzeit im Schlauch durch eine Verlängerung desselben oder eine langsamere Fließgeschwindigkeit könnte die Dialysewirkung steigern, die Methode mit einer den Schlauch offen haltenden Drahtfeder ließ sich mit den verwendeten Schläuchen jedoch nicht erfolgreich umsetzen.

Der Bau einer neuen, länglichen Anlage, vielleicht sogar eines waschwasserführenden Schlauchs um den Dialyseschlauch herum könnte die Ergebnisse optimieren, ebenso der Einsatz eines weniger empfindlichen Schlauchmaterials, das nicht zu Knicken und Perforationen neigt.

#### 4.1.5 Zusammenfassung

Es wurden Versuche unternommen, um die optimalen Bedingungen für die Synthese von nadelförmigen Fluorapatitpartikeln zu ermitteln. Diese wurden bei Ionenkonzentrationen von  $\text{Ca}^{2+} : \text{PO}_4^{3-} : \text{F}^-$  von 10:6:2 mM, einem pH-Wert von 6 und einer Temperatur von 60 °C nach 10 Minuten Versuchsdauer gefunden.

Der Einsatz der Polymere PAH, PSS und PAS hatte bei verschiedenen Konzentrationen und Randbedingungen keine Effekte oder verschlechterte die Ausbeuten.

Daher wurden die Versuche zur Kristallisation im elektrischen Feld mit oben genannten Versuchsbedingungen durchgeführt, wobei auch nadelförmige Strukturen erhalten wurden, die sich jedoch nicht an den Feldlinien ausrichteten. Ein stärkeres Feld über eine höhere Spannung und geringerer Entfernung zwischen den Elektroden könnte dies eventuell ändern.

Bei den Kristallisationen unter Dialyse mussten die Konzentrationen aufgrund des Verlusts an Ionen und Verdünnungseffekten höher gewählt werden, Temperatur und pH konnten jedoch auf die als günstig ermittelten Werten eingestellt werden. Die Dialyse lief zwar nie in dem Sinne vollständig ab, dass am Auslauf der Dialysezelle eine Lösung ohne Ionen und nur mit Kristalliten ankam, es konnte jedoch gezeigt werden, welche Bedingungen die Dialyse begünstigen, und welche Maßnahmen zukünftig ergriffen werden könnten, um zum gewünschten Ergebnis zu kommen.

## **4.2 Untersuchungen an menschlichen Zähnen nach Ätzung zur orthodontischen Fixierung und Bleichung**

### **4.2.1 Einleitung**

Bereits vor dieser Dissertation durchgeführte Untersuchungen zur Nickelfreisetzung aus orthodontischen Drähten<sup>[43]</sup> zur Korrektur von Zahnfehlstellungen führten zur Frage, wie das Zahnmaterial von den Drahtbefestigungseinheiten, den so genannten Brackets, mit denen es permanent in Kontakt steht, beeinflusst wird. Die Zahnspangendrähte sind in die Brackets eingespannt und üben so eine Zug- oder Druckwirkung auf die Zähne aus, wodurch nicht unbeträchtliche Kräfte auf das Zahnmaterial wirken. Da dieses vor der Fixierung der Brackets behandelt werden muss und somit angegriffen ist, kann es zu Schmerzen durch Verletzung der Zahnoberfläche kommen.

Die Brackets können durch den Einsatz von Säuren oder Laserlicht<sup>[44]</sup> zur Aufrauung des Zahnminerals einerseits und verschiedenen kommerziellen Klebstoffen<sup>[45]</sup> andererseits fixiert werden. Die im Laufe der Untersuchungen festgestellten Veränderungen der Zahnoberfläche führten zur Frage, ob auch heutzutage eingesetzte Mittel zur kosmetischen Aufhellung von Zähnen ähnliche Effekte hervorrufen könnten.

Diese auf Wasserstoffperoxid bzw. Carbamidperoxid<sup>[46]</sup> beruhenden Bleichmittel werden heutzutage bereits verwendet, obwohl unsachgemäße Anwendung durchaus mit Risiken<sup>[47]</sup> behaftet ist, z. B. der Reizung des Zahnfleisches oder der Sensibilisierung der Zähne gegenüber Temperaturwechseln.

#### 4.2.2 Die Aufrauung von Zähnen durch Ätzung

Schon seit mehr als fünfzig Jahren wird das Ätzen<sup>[48]</sup> der Zahnoberfläche zur Verbesserung der Haftung von Füllmaterial angewandt. Dafür besonders geeignete zusätzliche Adhäsive<sup>[49]</sup> wurden bereits kurz danach vorgestellt. 1965 wurde diese Technik erstmals in die Kieferorthopädie zur Befestigung von Zahnsparren eingeführt<sup>[50]</sup>. Der große Erfolg der Säure-Ätz-Technik machte diese seitdem zu einem Standardverfahren bei der dauerhaften Befestigung in der Kieferorthopädie. Es wurden jedoch schon kurz nach der Einführung dieser Methode Untersuchungen an auf verschiedene Weise behandelten<sup>[51,52]</sup> Zahnmaterial unternommen, die einen Verlust an Zahnmaterial zeigten. Die daraus resultierenden morphologischen Änderungen wurde seit Mitte der siebziger Jahre nach einem Dreipunktsystem<sup>[53,54]</sup> quantifiziert, das sich allerdings auf aus heutiger Sicht recht ungenaue rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen stützte. Die beim Ätzen hervortretenden dreidimensionalen Strukturen wurden nicht berücksichtigt, obwohl diese durch eine Vergrößerung der Oberfläche einen hohen Anteil an der verbesserten Adhäsivwirkung haben. Auch neuere Studien<sup>[55-58]</sup> beurteilen ihre Beobachtungen zur Struktur des Zahnschmelzes dahingehend eher qualitativ. Dass mit einer Säurebehandlung Veränderungen an einer Zahnoberfläche einhergehen, kann man bereits mit bloßem Auge am kreidig-weißen Aussehen der betreffenden Stellen erkennen. Dass dabei außerdem Schmelzprismen<sup>[59]</sup> in einer sogenannten Honigwabenstruktur<sup>[60]</sup> unter der Oberfläche hervortreten<sup>[61]</sup> und das vor der Aushärtung flüssige Adhäsiv somit die Möglichkeit hat, in die Oberflächenstruktur einzudringen, lässt sich erst unter dem Rasterelektronenmikroskop nachweisen. Durch dieses Eindringen in die durch das Ätzen ohnehin schon beschädigte Oberfläche kann es zu Frakturen im Enamel kommen, wenn die Befestigung nach abgeschlossener Behandlung gelöst werden<sup>[62,63]</sup> soll. Die Grenzflächen zwischen Enamel, Dentin und

verschiedenen Adhäsiven sind Gegenstand vieler Forschungsbemühungen<sup>[64-66]</sup> geworden.

Um diesen Problemen aus dem Weg zu gehen wurden auch das sogenannte *Crystal bonding*<sup>[67]</sup> und chemisch wirksamere Klebstoffe zur Befestigung der Brackets<sup>[68]</sup> eingesetzt, beides konnte jedoch nicht an die Festigkeit der Ätzmethode heranreichen.

Somit ist man auch heute noch auf den Einsatz von üblicherweise Phosphorsäure angewiesen, die teilweise auch schon direkt in ein Adhäsiv eingebracht, welcher dann als „selbstätzend“<sup>[69]</sup> bezeichnet wird. Trotzdem führt Säurewirkung immer zu einem kleinen, aber messbaren Schaden am Zahn. Die Feststellung des Umfangs dieser Schädigung und dessen dreidimensionale Darstellung waren Ziel dieser Dissertation.

#### **4.2.3 Probenpräparation**

Die untersuchten Zahnexemplare wurden vom Projektpartner Prof. Dr. A. Klocke, UKE Hamburg-Eppendorf (heute University of California, San Francisco), zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um 3. Molare, also Backenzähne, die erst wenige Tage bis Wochen zuvor explantiert und danach in 0.1% Thymol-Lösung aufbewahrt worden waren.

Da ein kompletter Zahn durch seine Größe bei den nachfolgenden rasterelektronenmikroskopischen Messungen nur schwer zu handhaben gewesen wäre, wurden mit einer dünnen Trennscheibe Plättchen von der Seite des Zahns abgesägt. Diese wurden auf einer Seite mit der phosphorsäurehaltigen Ätzpaste *Total Etch*<sup>®</sup> von ivoclar vivadent eine Minute lang behandelt und dann mit Wasser abgespült, was von der Vorgehensweise her der Tätigkeit eines Kieferorthopäden bei der Behandlung eines Menschen entspricht.

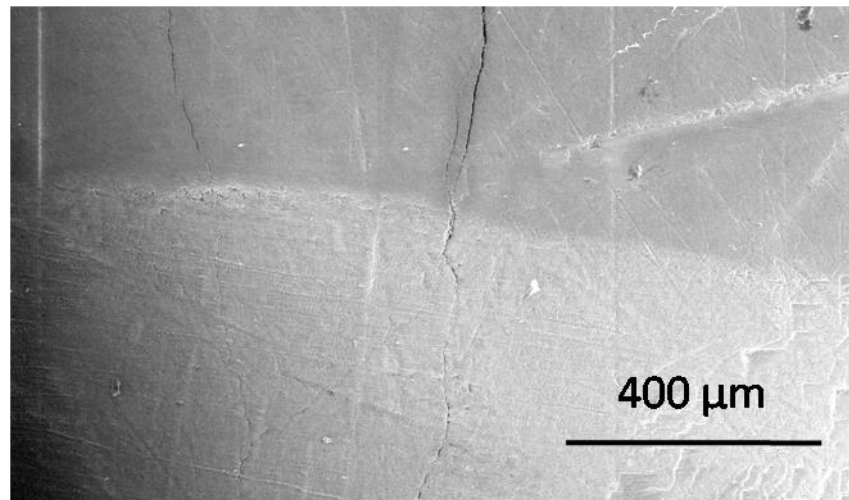


**Abb. 4.2.3.1:** Ätzpaste mit zersägtem Zahn und abgesägten Stücken

Nach der vorsichtigen Trocknung ließ sich schon eine kreidig-weiße Farbe des geätzten Bereichs erkennen, die sich erkennbar vom ungeätzten Teil abhob; für Fotos war die Fläche jedoch zu klein.

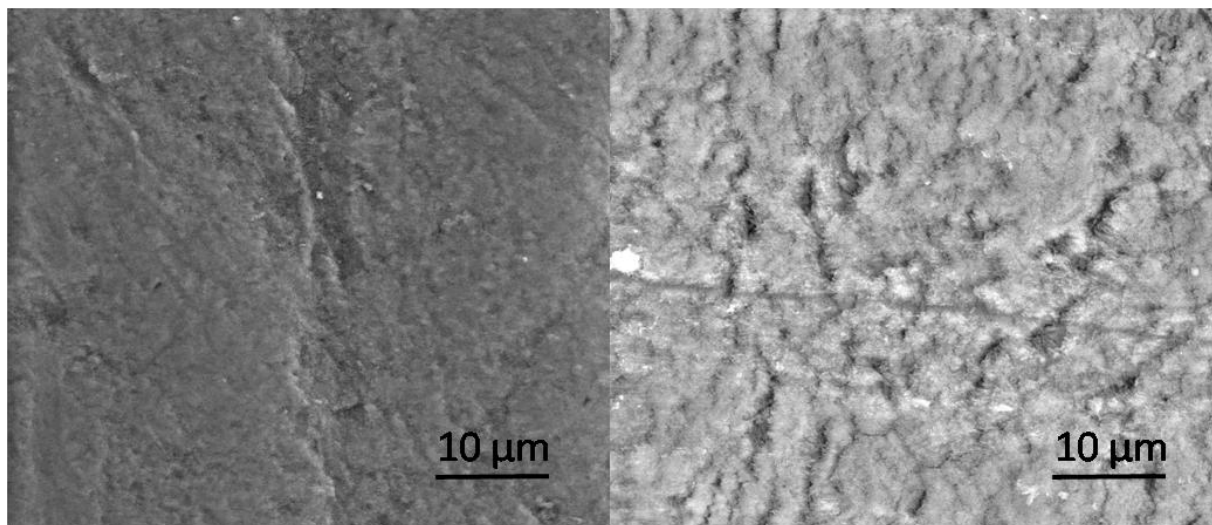
Die teilweise geätzten Zahnstücke wurden dann aufgrund des Einsatzes des ESEM-Modus ohne Sputtering im ESEM Quanta 400 untersucht. Später wurden auch Nahaufnahmen im Standard-Modus mit gesputterten Proben durchgeführt, um kleinere Details sichtbar zu machen. Dies war ebenfalls notwendig, da der zur Erreichung des euzentrischen Punkts (siehe Kapitel 3.6) notwendige hohe Abstand vom Probenstisch zum Polschuh des Mikroskops einen Einsatz des ESEM-Modus kaum noch möglich machte. Der ESEM-Modus konnte nur bei geringen Abständen von ca. 6 mm vom Polschuh zur Probenoberfläche genutzt werden, der euzentrische Punkt des verwendeten Geräts lag jedoch doppelt so weit entfernt. Nur an diesem Punkt konnten realistische 3D-Rekonstruktionen aus gekippten Bildern vorgenommen werden.

#### 4.2.4 ESEM Aufnahmen der geätzten Zähne



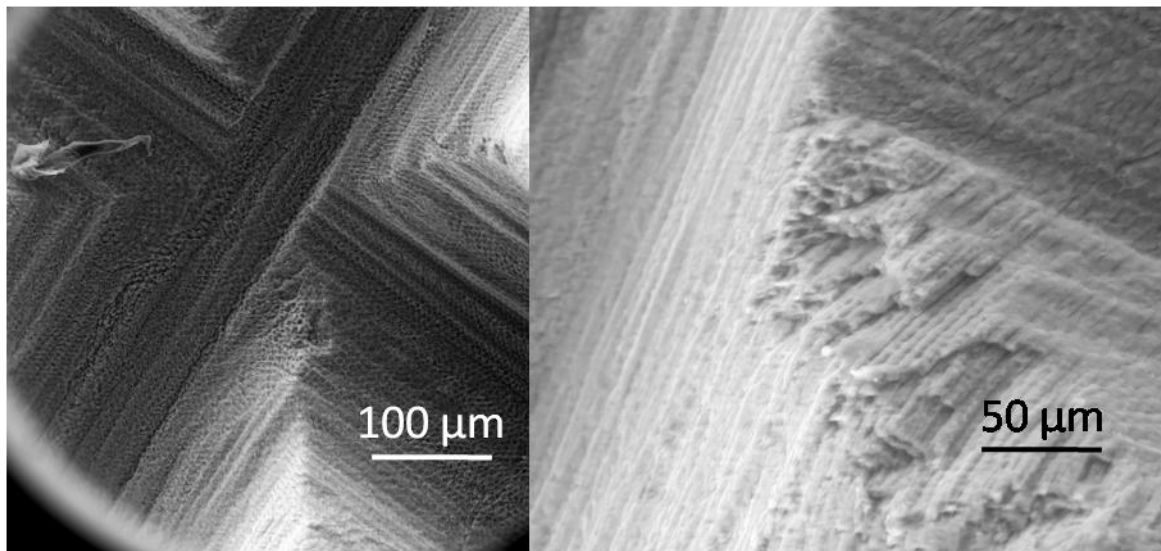
**Abb. 4.2.4.1:** Grenze zwischen geätztem (unten) und ungeätztem Bereich (oben)

Die im ESEM aufgenommenen Bilder zeigen klar den Unterschied zwischen geätzter und ungeätzter Seite. Durch die Ätzung kommt eine Feinstruktur des ansonsten glatten Enamels zum Vorschein, die Oberfläche wird rauer.



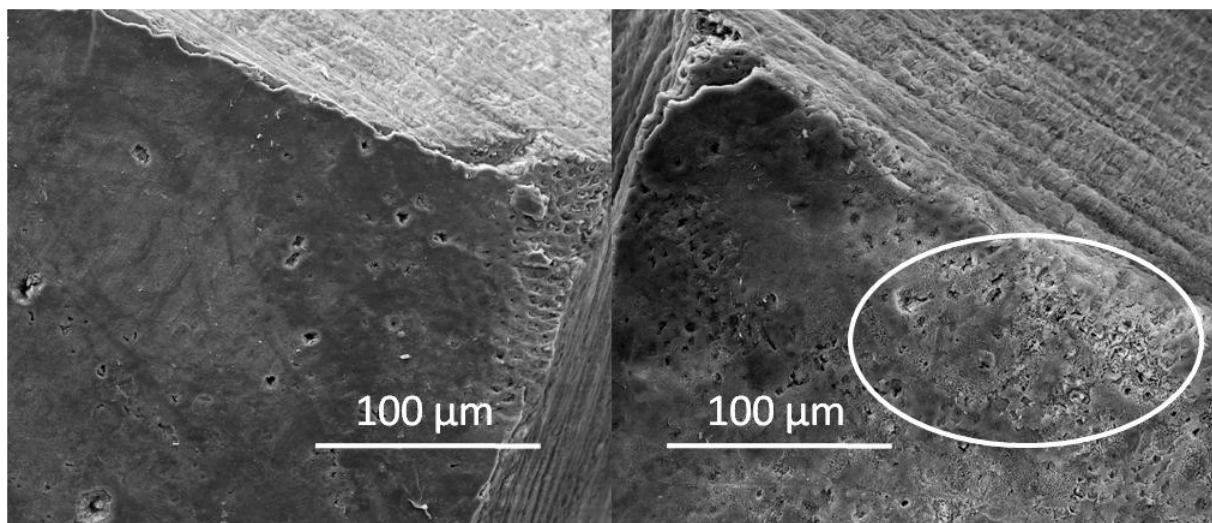
**Abb. 4.2.4.2:** ungeätzter (links) und geätzter (rechts) Zahn

Die ersten Versuche zeigten, dass es notwendig war, eine Möglichkeit zu schaffen, sich auf der Probenoberfläche zu orientieren, damit bei eventuellen späteren Aufnahmen ein bestimmter Ort erneut aufgesucht werden konnte. Zu diesem Zweck wurden mit einem feinen Zahnarztbohrer kleine Kreuze in die folgenden Proben geritzt.



**Abb. 4.2.4.3:** Mit einem Bohrer in die Zahnoberfläche geritztes Kreuz zur Orientierung

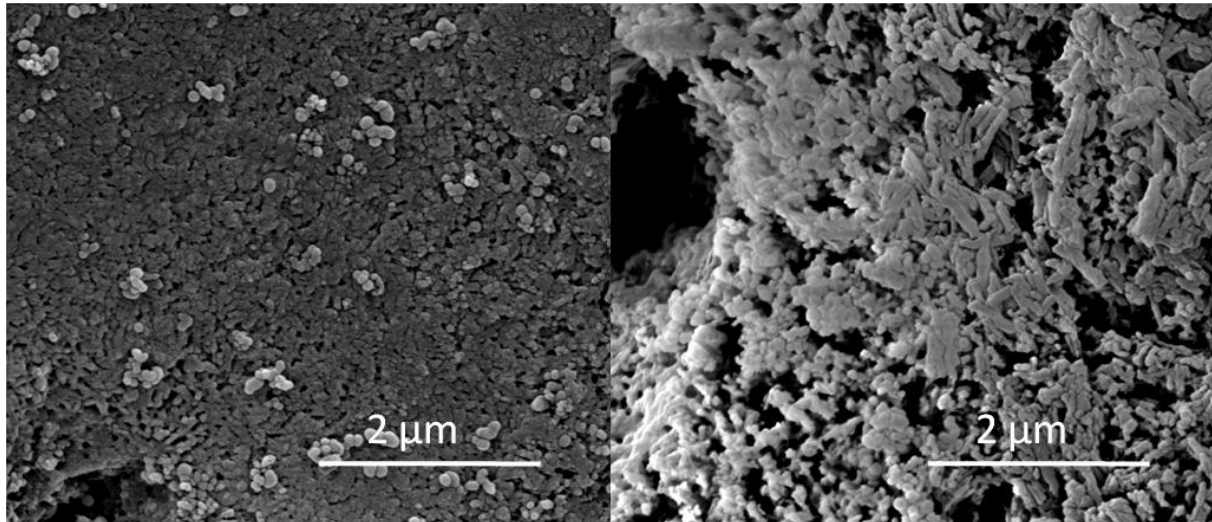
Die sehr feinen, nur etwa 0.5 mm breiten Bohrspuren erscheinen unter dem Rasterelektronenmikroskop natürlich ungleich größer, sie sind zu groß für einen einzelnen Bildausschnitt. In Abb. 4.2.4.3 links ist ein gebohrtes Kreuz in der kleinstmöglichen Vergrößerung dargestellt, auf dem rechten Bild erkennt man den vom Bohrer freigelegten faserigen Aufbau des Enamels.



**Abb. 4.2.4.4:** Der linke untere ungeätzte Quadrant eines Kreuzes und der rechte untere geätzte Quadrant; Die Ätzung ist besonders im weißen Kreis erkennbar.



In Abb. 4.2.4.4 sind zwei etwa 500  $\mu\text{m}$  voneinander entfernte Bereiche auf der Zahnoberfläche, die durch einen Bohrgraben getrennt sind, dargestellt. Man kann deutlich die Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit zwischen dem linken, ungeätzten und dem rechten, geätzten Bereich erkennen.



**Abb. 4.2.4.5:** Vergrößerungen der in Abb. 4.2.4.4 gezeigten Bereiche; links ungeätzt, rechts geätzt

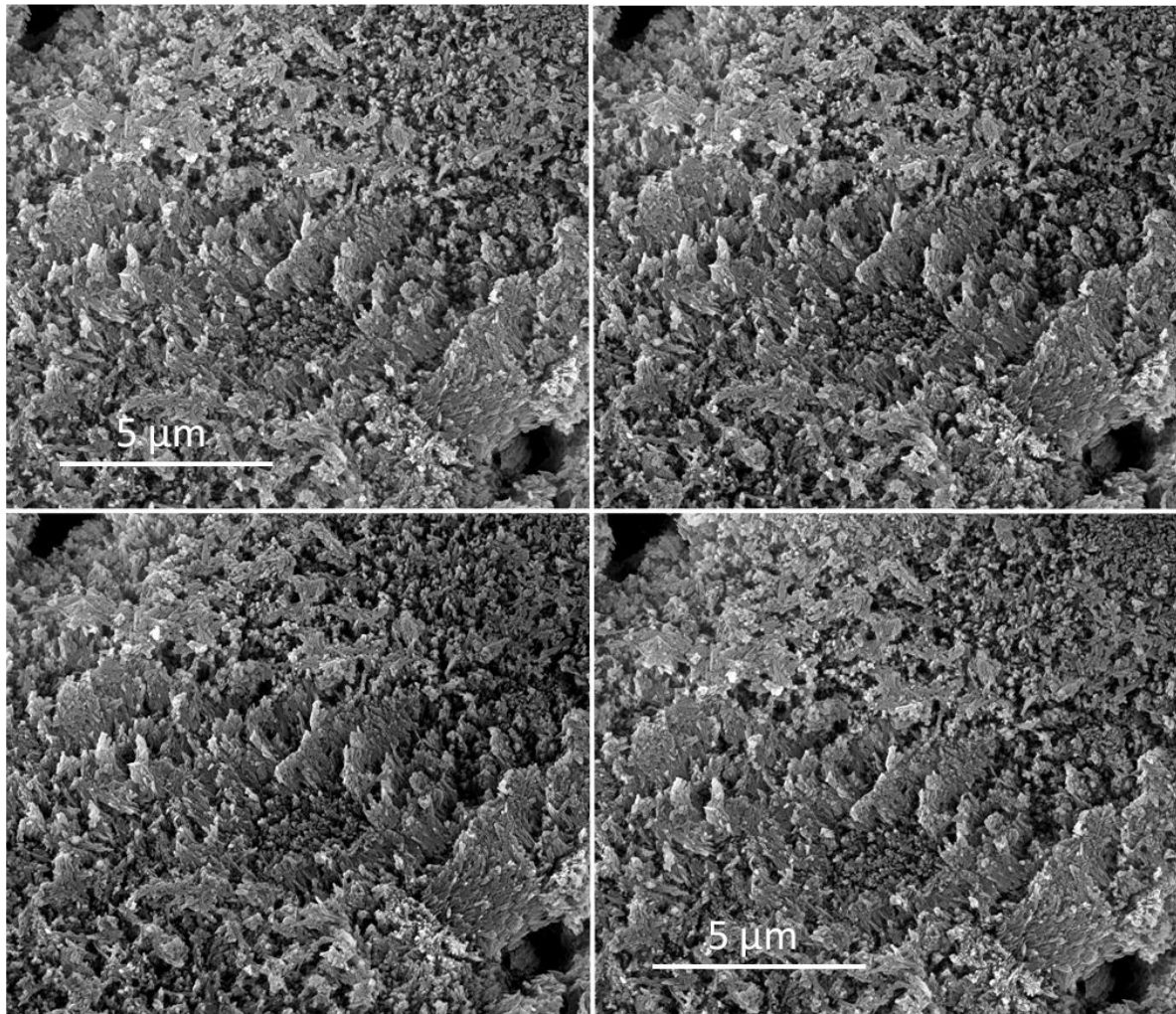
Eine Vergrößerung von 50.000 enthüllt die Wirkung der Phosphorsäure. Die im ungeätzten Zustand nicht erkennbaren, unter der Oberfläche verborgenen Schmelzprismen werden freigelegt. Der glatte, leicht spiegelnde Zahn wird so rau, dass auftreffendes Licht stärker gestreut wird, was zur für das Auge sichtbaren weißen Farbe führt.

Eine Erhöhung der Rauigkeit ist auf den zweidimensionalen rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zwar sichtbar, jedoch nicht quantifizierbar, weshalb Anstrengungen unternommen wurden, ein möglichst genaues dreidimensionales Relief der Oberfläche zu erhalten.

Dazu wurde einerseits die indirekte Methode der 3D-Rekonstruktion mit Hilfe von Software und andererseits die direkte Methode der Oberflächenabrasterung mittels eines Rasterkraftmikroskops (AFM) angewandt.

#### 4.2.5 3D-Rekonstruktion aus rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen

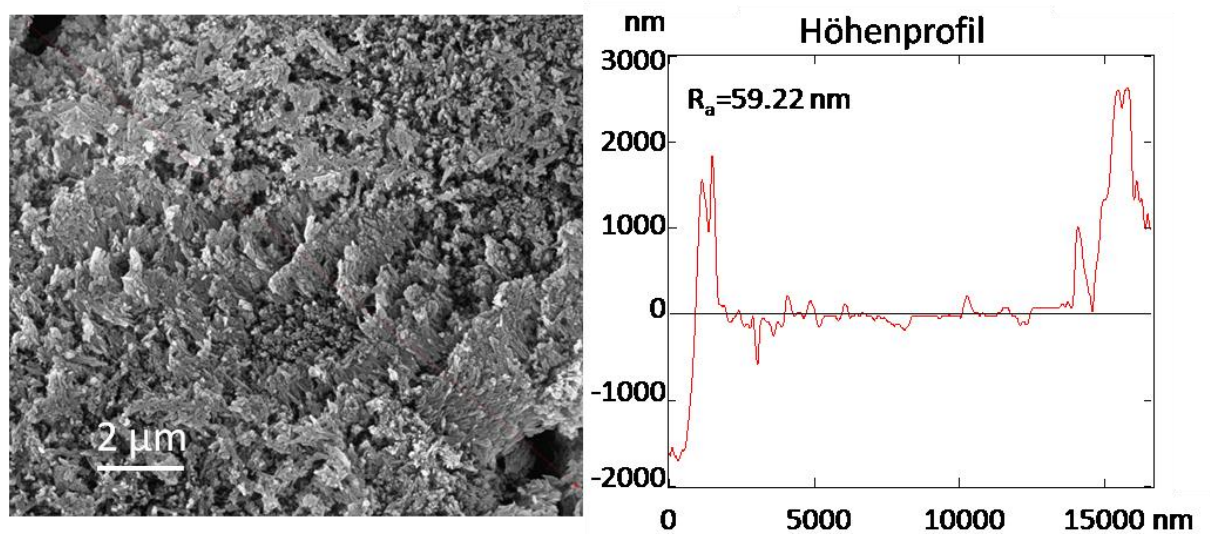
Mit Hilfe des in Kapitel 3.6 beschriebenen Programms Scandium 5.0 wurden 3D-Rekonstruktionen aus gekippten Bildern erzeugt, um Informationen über die Oberflächentopographien zu erhalten. Die in Kapitel 3.6 beschriebenen Schwierigkeiten ließen es nicht zu, die benötigten Bilder im ESEM-Modus aufzunehmen, da dabei ein hoher Abstand von Probe zu Polschuh erfolgreiches Arbeiten verhindert. Eben dieser hohe Abstand ist jedoch unumgänglich für die Positionierung der Probe am euzentrischen Punkt, sodass alle folgenden Aufnahmen im Standard-Hochvakuum-Modus gemacht wurden.



**Abb. 4.2.5.1:** Aufnahmen vom gleichen Ort eines geätzten Zahns bei 0° (oben links), +5° (oben rechts), +10° (unten links) und -3° (unten rechts).

Es wurden mehrere Serien von Bildern aufgenommen, manche aus bis zu sechs Bildern in unterschiedlicher Kippung, manche aus nur zwei um einen bestimmten Winkel gegeneinander verkippt.

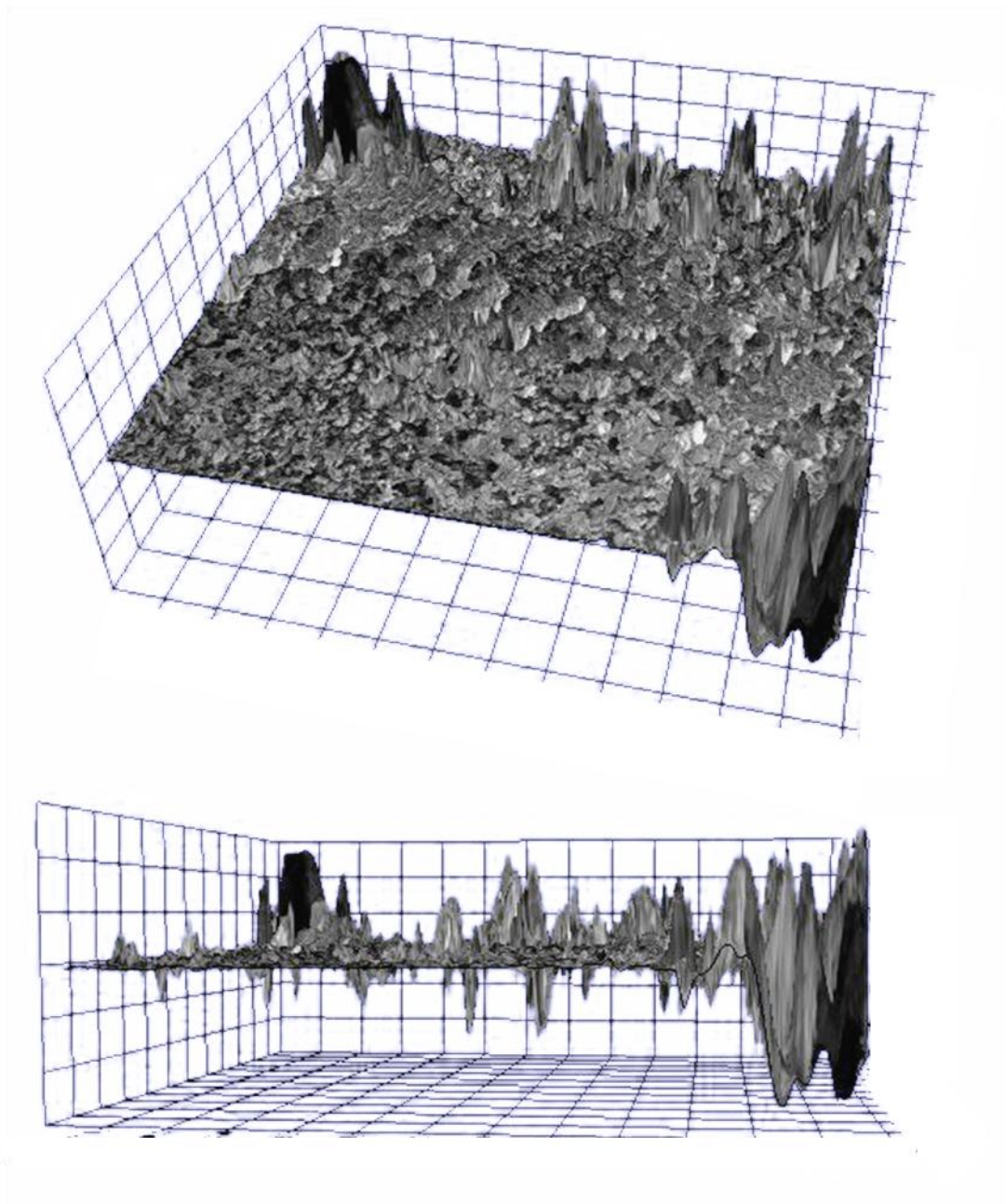
Abbildung 4.2.5.1 zeigt vier Bilder einer Sechsserserie, die alle vom Bildausschnitt her so genau wie möglich übereinstimmen. Weiteres Kippen in die Minusrichtung war aus apparativ nicht möglich, es sollte jedoch auch nicht notwendig sein.



**Abb. 4.2.5.2:** Stereobild der in Abb. 4.2.5.1 gezeigten Bilder (links) und daraus resultierendes Höhenprofil diagonal von links oben nach rechts unten (rechts)

In Abb. 4.2.5.2 links ist ein beispielhaftes Stereobild gezeigt, das sich in diesem Fall aus allen sechs Bildern der Sechsserserie ergab. Es sieht realistisch aus, doch schon das Höhenprofil rechts daneben lässt Abweichungen von den Erwartungen erkennen. Es beginnt links oben in einem Loch, das als dunkler Fleck erkennbar ist und stellt dieses auch als Vertiefung dar, direkt danach soll jedoch eine Erhöhung um 2 µm folgen, die auf den ESEM Aufnahmen so nicht erkennbar ist, genau wie die im Höhenprofil am Ende dargestellte starke Erhöhung um fast 3 µm. Das Stereobild impliziert stattdessen eine hügelige Ebene, aber auch der Mittelteil der Linie ist zu flach, um als real angesehen zu werden. Das Profil müsste eigentlich in einer Vertiefung enden, da die gezogene

Höhenprofillinie im Loch rechts unten endet, doch die Linie endet oberhalb der Ebene, was ebenfalls unrealistisch ist. Sehr deutlich werden die Abweichungen in Abb. 4.2.5.3, einer aus dem Stereobild erzeugten 3D-Oberfläche.



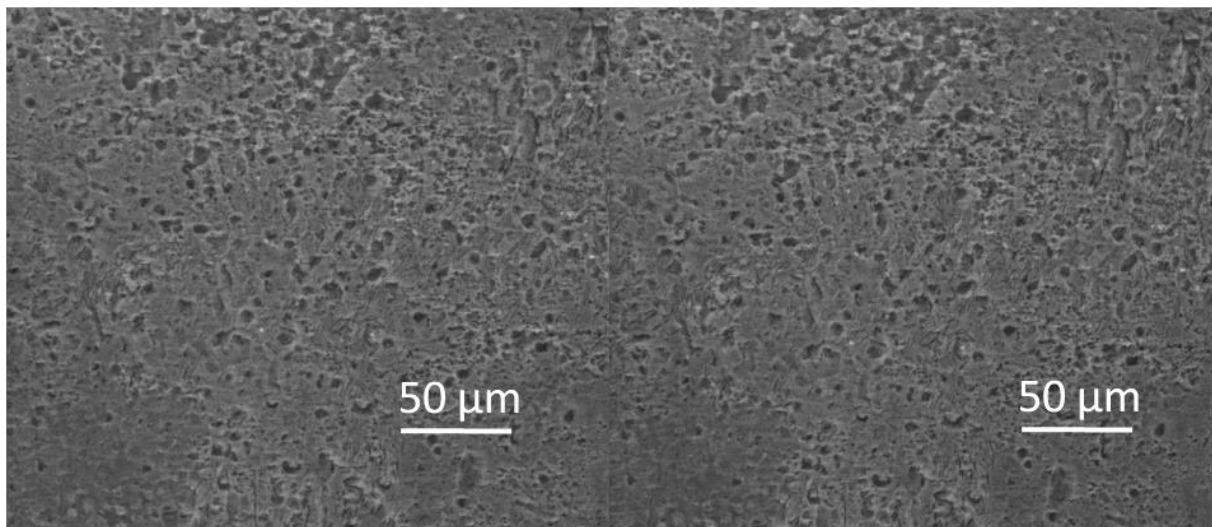
**Abb. 4.2.5.3:** 3D-Oberfläche, erzeugt aus dem Stereobild in Abb. 4.2.5.2

In oben gezeigter 3D-Oberfläche ragen die dunklen Löcher teilweise aus der Ebene heraus, dazu sind viele stachelartige Bildfehler zu erkennen, besonders am Rand. Dies kann zum Teil auf eine unvollständige Überlappung der



unterschiedlichen Aufnahmen zurückgeführt werden, da die Fehler jedoch auch relativ weit mittig auftreten kann dies nicht der einzige Grund sein. Die durch die Ätzung entstandene Oberflächenrauigkeit bleibt unsichtbar, wie nach der flachen Mitte des Oberflächenprofils nicht anders zu erwarten.

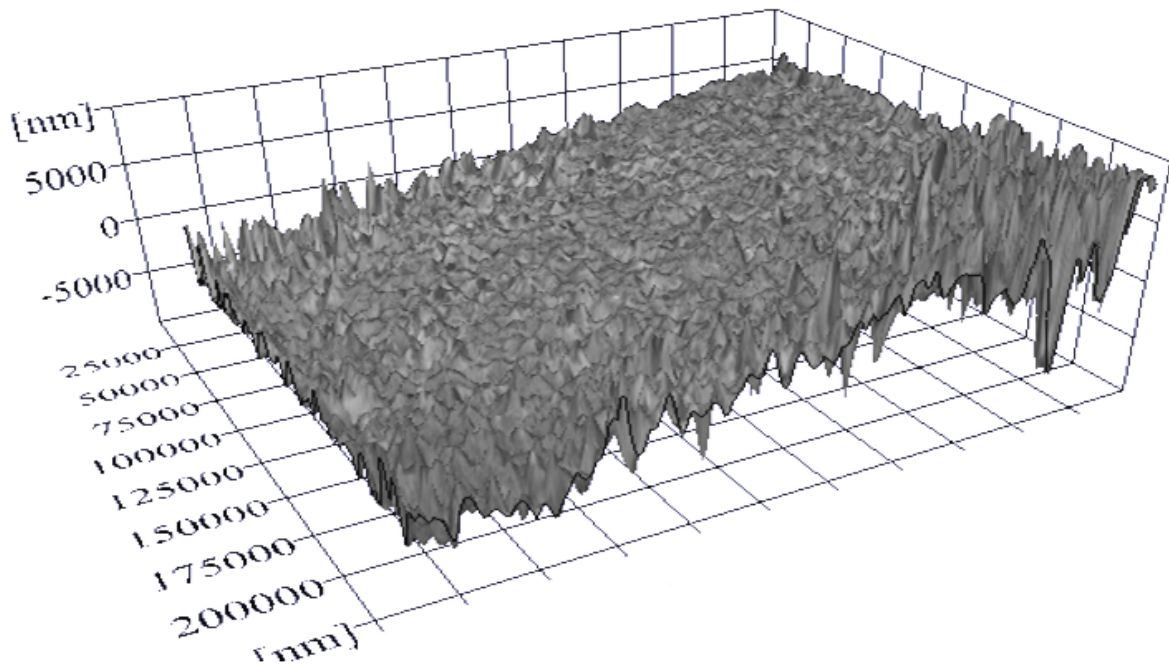
Ein weiteres Beispiel eines um 3 Grad in beide Richtungen verkippten Bildpaars ist in Abb. 4.2.5.4 dargestellt:



**Abb. 4.2.5.4:** Geätzter Zahn um  $+3^\circ$  (links) und  $-3^\circ$  (rechts) gekippt

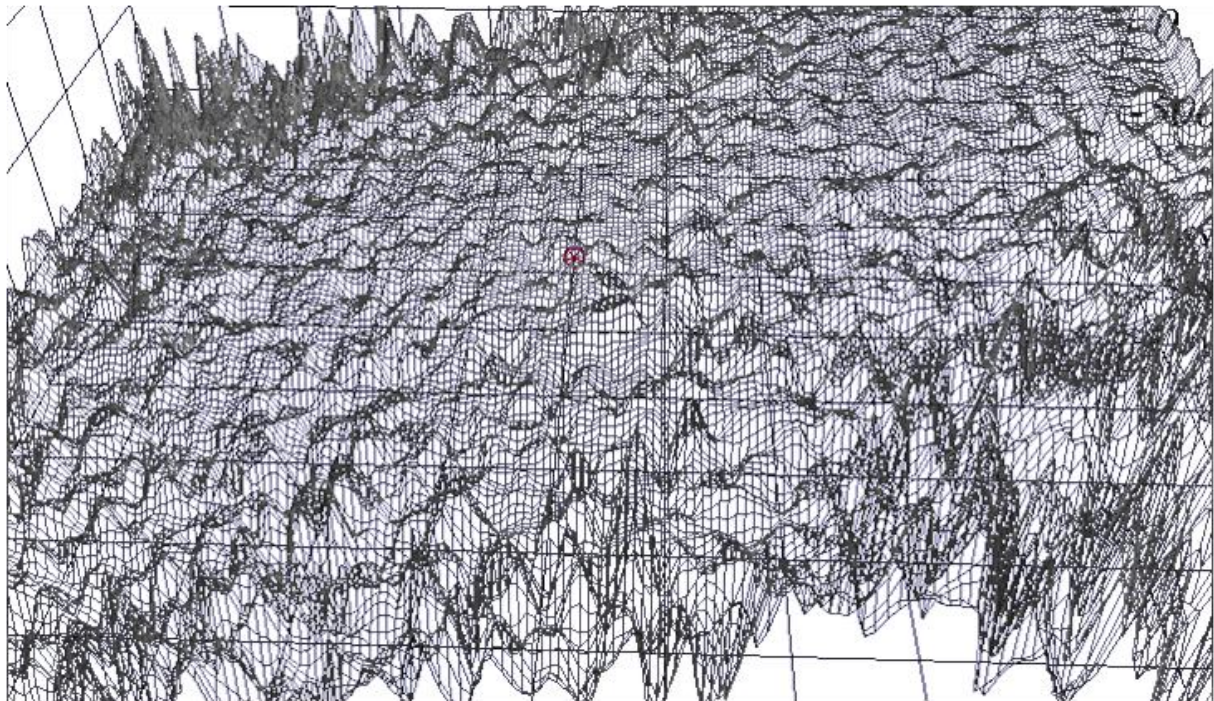
Die Bildausschnitte stimmen erneut gut miteinander überein, was bei relativ geringen Verkippungen jedoch auch einfacher zu erreichen ist als bei hohen Verkippungen um  $5^\circ$  oder mehr. Durch starke Winkelunterschiede lassen sich keine exakt gleichen Bildausschnitte mehr aufnehmen.

Die 3D-Oberfläche in Abb. 4.2.5.5 hat zwar weniger Fehler, ist aber besonders am Rand erneut nicht fehlerfrei, da die hohen Stacheln entweder überall auf der sehr gleichförmigen Oberfläche auftreten müssten oder nirgends. Man erkennt zwar eine dreidimensionale Hügelstruktur, diese ist jedoch nicht an die dunkel erkennbaren eingätzten Löcher gebunden.



**Abb. 4.2.5.5:** 3D-Oberfläche aus gekippten Bildern in Abb. 4.2.5.4

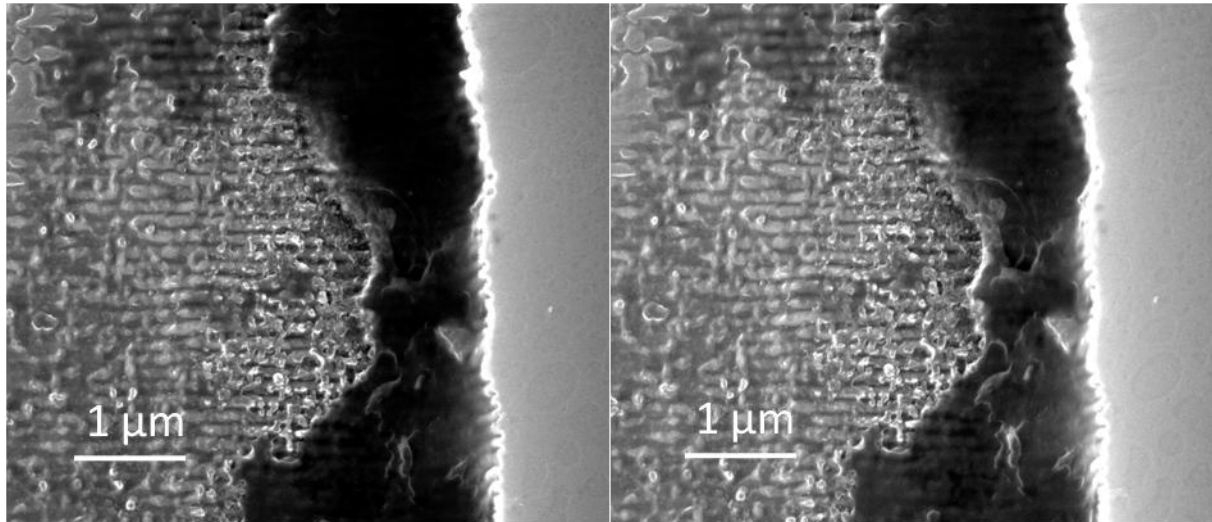
Man kann also erneut nicht von einem realistischen dreidimensionalen Relief sprechen, was in Abb. 4.2.5.6 noch deutlicher wird.



**Abb. 4.2.5.6:** Umrissbild, erstellt aus der 3D-Oberfläche in Abb. 4.2.5.5 (oben)

Im in Abb. 4.2.5.6 gezeigten Umrissbild ist zwar eine „Hügellandschaft“ gut erkennbar, doch hängt diese leider nicht von der Ätzstruktur ab, die eher aus einer löchrigen Ebene bestehen müsste.

Im dritten Beispiel in Abb. 4.2.5.7 wird dies besonders deutlich.

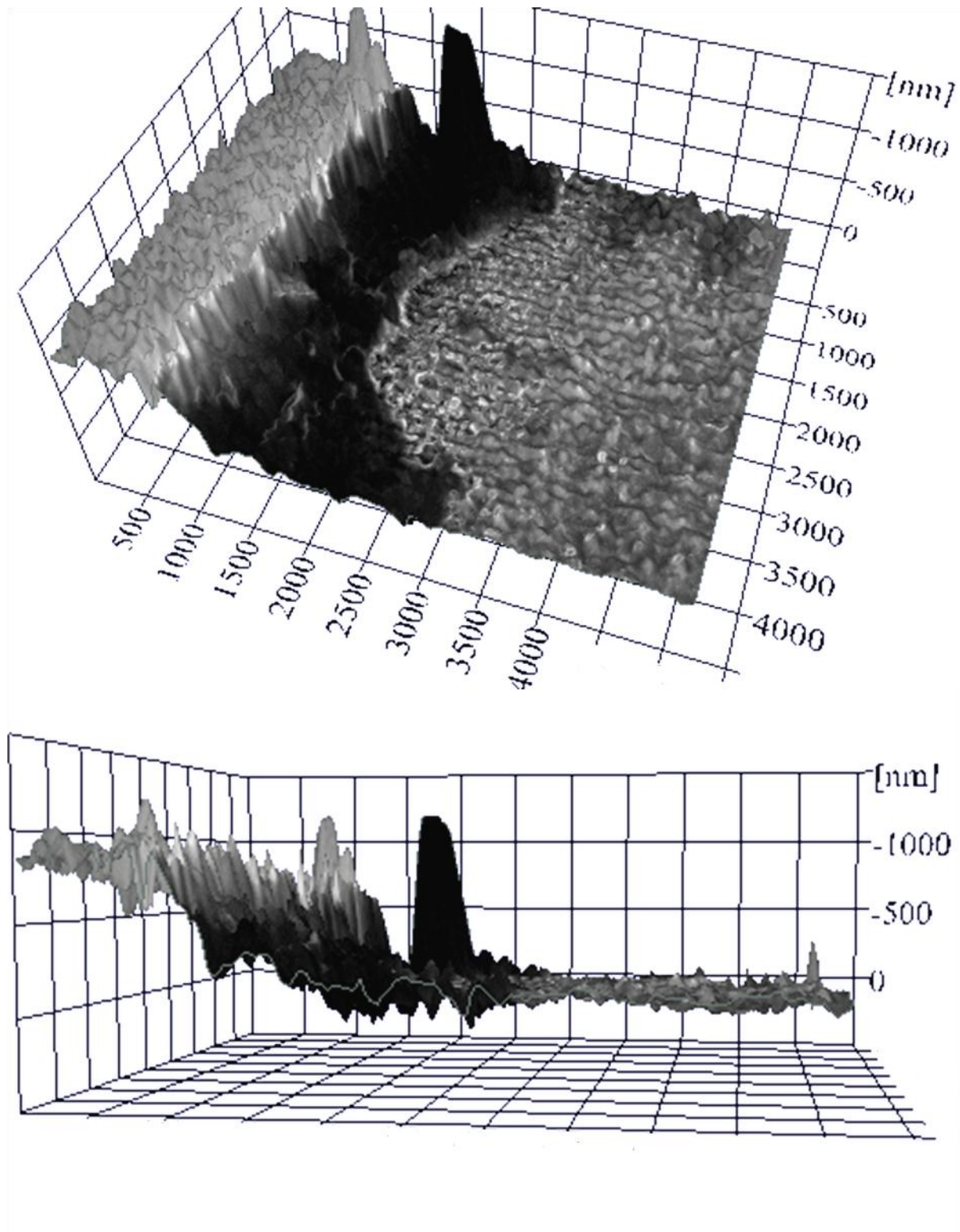


**Abb. 4.2.5.7:** Eine Kante an einer Ebene; linkes Bild  $+2^\circ$  gekippt, rechtes Bild  $-2^\circ$  gekippt

Die oben dargestellten Bilder wurden bei einer in diesem Bezug sehr hohen Vergrößerung von 50.000 aufgenommen und zeigen eine Kante an einer Ebene. Als Verkippungen wurden in diesem Fall nur  $\pm 2^\circ$  gewählt und die resultierende 3D-Oberfläche in Abb. 4.2.5.8 gibt zumindest prinzipiell den Niveauunterschied zwischen der oberen Ebene rechts im Bild und unterer Ebene links wieder. Es treten zwar erneut Fehler wie zum Beispiel der schwarze Balken am Rand auf, welche aber klar als solche zu erkennen sind und sich falls nötig durch Zuschneiden entfernen ließen. Der durch die Seitenansicht abschätzbare Höhenunterschied von ca. 800 nm zwischen der helleren oberen und der dunkleren unteren Ebene stellt wahrscheinlich annähernd reale Dimensionen dar, genau lässt sich dies jedoch nicht beurteilen.

Desweiteren ist zu sehen, dass der in den zweidimensionalen Aufnahmen sehr glatte obere Abschnitt nach 3D-Rekonstruktion erneut hügelig bis stachelig aussieht, was erneut auf Berechnungsfehler zurückzuführen ist.





**Abb. 4.2.5.8:** 3D-Oberfläche aus Bildern in Abb. 4.2.5.7

Es lässt sich also abschließend sagen, dass mit den eingesetzten Mitteln qualitative Aussagen getroffen werden können, die Methode für quantitative Bestimmungen, beispielsweise der Rauigkeit, aber nicht genau genug ist.

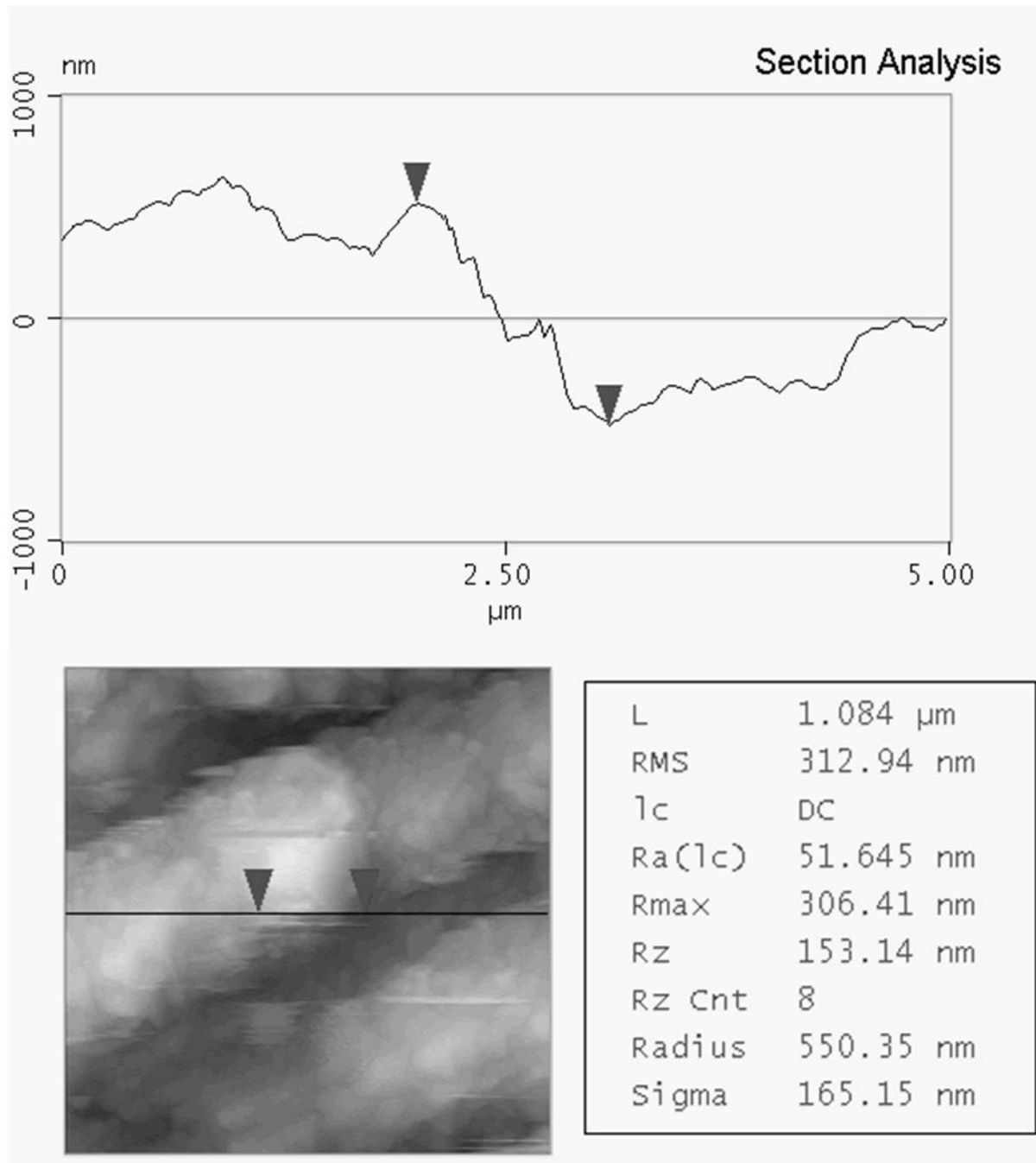


#### 4.2.6 AFM-Untersuchungen an geätzten Zähnen

Nach der Erkenntnis, dass mit 3D-Rekonstruktionen aus gekippten zweidimensionalen Bildern keine quantitativen Ergebnisse zu erzielen sind, wurde die Rasterkraftmikroskopie eingesetzt.

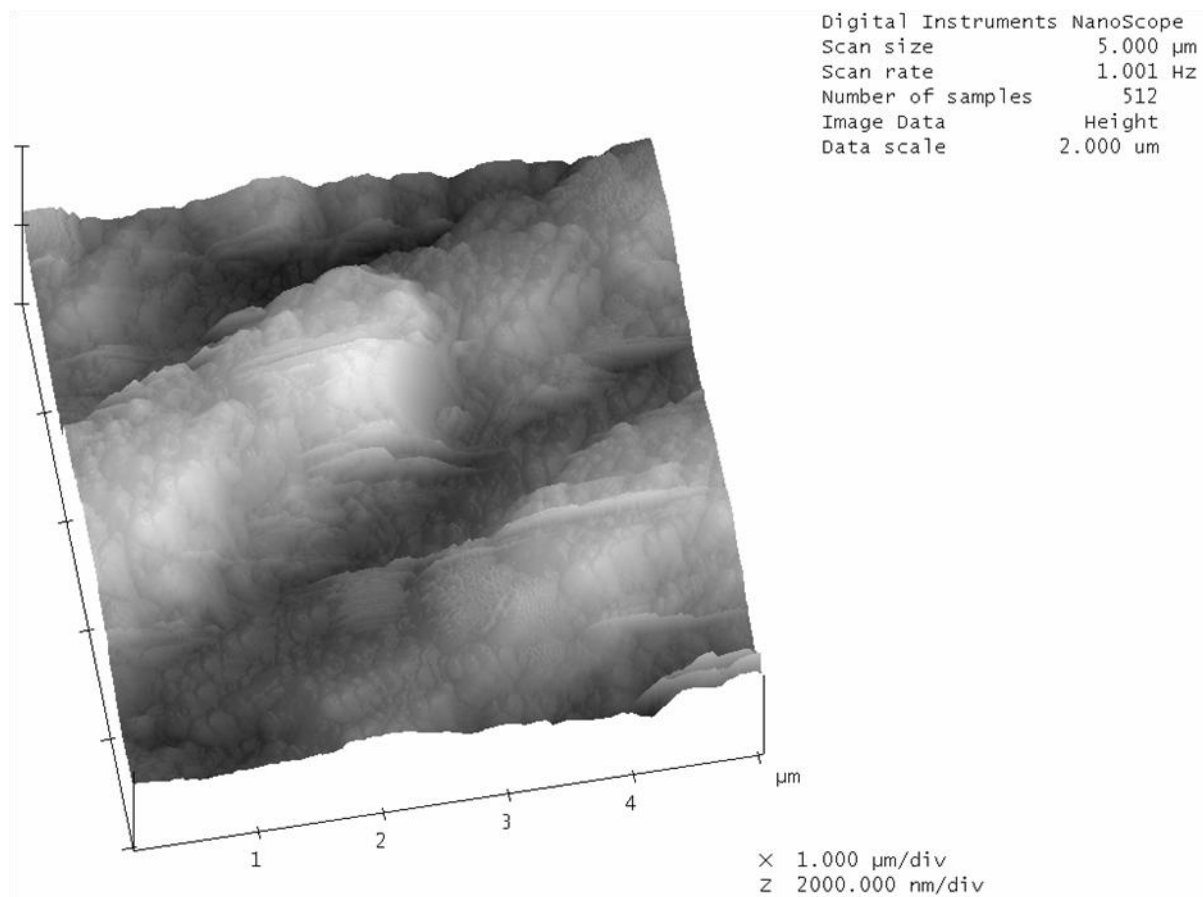
Mit einem Nanoscope MultiMode IIIa von Veeco Instruments wurden Messungen an zuvor mit phosphorsäurehaltiger Ätzpaste Total Etch<sup>®</sup> von Ivoclar Vivadent behandelten Zähnen durchgeführt. Die Ätzzeit betrug jeweils eine Minute, eine Verlängerung auf drei Minuten verursachte keine sichtbaren Unterschiede. Nach der Ätzung wurde die Paste jeweils großzügig mit klarem Wasser abgespült und vorsichtig mit Papier trockengetupft. Rückstände davon oder andere Verunreinigungen blieben nicht zurück.

Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind beispielhaft in Abb. 4.2.6.1 dargestellt. Unten links in Abb. 4.2.6.1 sind das AFM-Bild und mit dem horizontalen Strich darin die darüber dargestellte Höhenprofillinie gezeigt. Die beiden nach unten gerichteten Dreiecke markieren die Punkte, zwischen denen die rechts dargestellten Rauigkeitswerte bestimmt wurden. In der Höhenprofillinie oben findet man die beiden Dreiecke wieder und erkennt den Höhenunterschied zwischen diesen. Von den diversen rechts angegebenen Werten sind besonders die durchschnittliche Rauigkeit  $R_a$  und die Abstandswerte interessant. Mit „Horiz distance(L)“ ist der Abstand der beiden Messpunkte in x-Richtung, mit „Vert distance“ in y-Richtung gemeint, wohingegen „Surface distance“ die Länge des Weges ist, der von der Aufnahmenadel tatsächlich zwischen beiden Punkten abgefahren wurde. Diese ist durch die auftretenden Unebenheiten länger als eine bloße direkte Strecke zwischen beiden Punkten.



**Abb. 4.2.6.1:** AFM-Datensatz eines geätzten Zahns mit Höhenprofillinie (oben), dem aufgenommenen Bild (unten) und den dazugehörigen Werten (rechts)

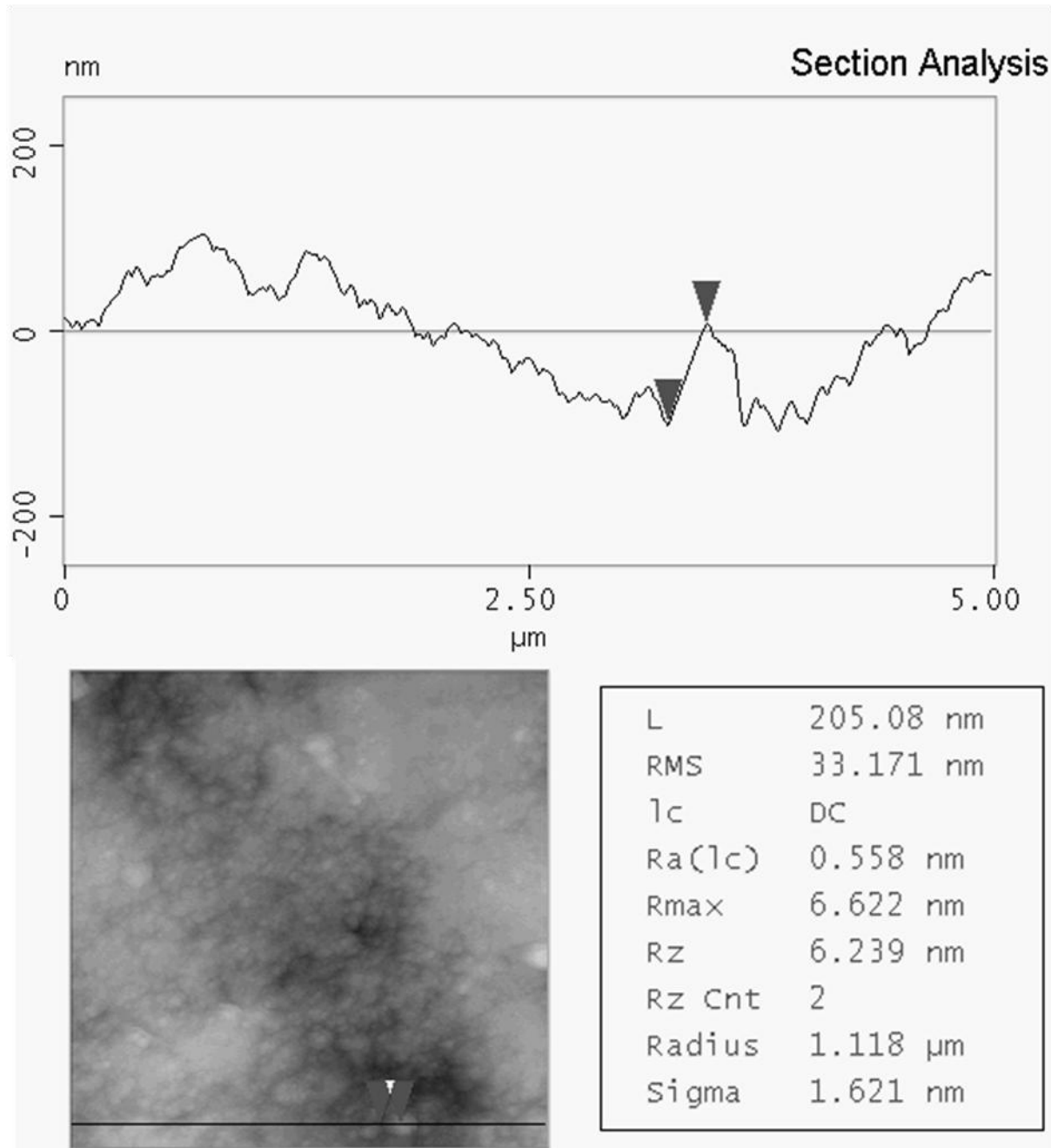
Im aus der AFM-Messung resultierenden dreidimensionalen Bild in Abb. 4.2.6.2 lassen sich ansatzweise die durch die Ätzung hervorgetretenen Schmelzprismen erkennen. Ebenso kann man an den Querlinien von links nach rechts die Rasterrichtung der Nadel sehen, es handelt sich dabei um Messartefakte.



**Abb. 4.2.6.2:** Vergrößerung und dreidimensionale Darstellung der AFM-Aufnahme in Abb. 4.6.2.1

Der AFM-Datensatz einer ungeätzten Stelle auf einem Zahn in Abb. 4.2.6.3 zeigt eine deutlich glattere Oberfläche als die der geätzten Stelle in Abb. 4.2.6.1, obwohl diese vom gleichen Zahn stammen. Beim geätzten Bereich beträgt der größte Höhenunterschied mehr als 1000 nm, beim ungeätzten Bereich ungefähr 200 nm, wobei allerdings gesagt werden muss, dass diese Abstände stark vom Ort der Linie abhängen. In Abb. 4.2.6.3 unten links im AFM-Bild ist zu sehen, dass die Linie fürs Höhenprofil weit unten gelegt ist, wo die tiefste Stelle des breiten Grabens liegt und somit auch der größte Höhenunterschied des gesamten abgerasterten Bereichs zu erwarten ist. Eher mittig im Bild wäre dieser Unterschied noch geringer. In Abb. 4.2.6.1 ist die Linie sehr mittig über die höchste Erhebung und tiefste Vertiefung des geätzten Bereichs, etwas weiter oben wäre das Höhenprofil wesentlich flacher. Auch innerhalb der Linie kann

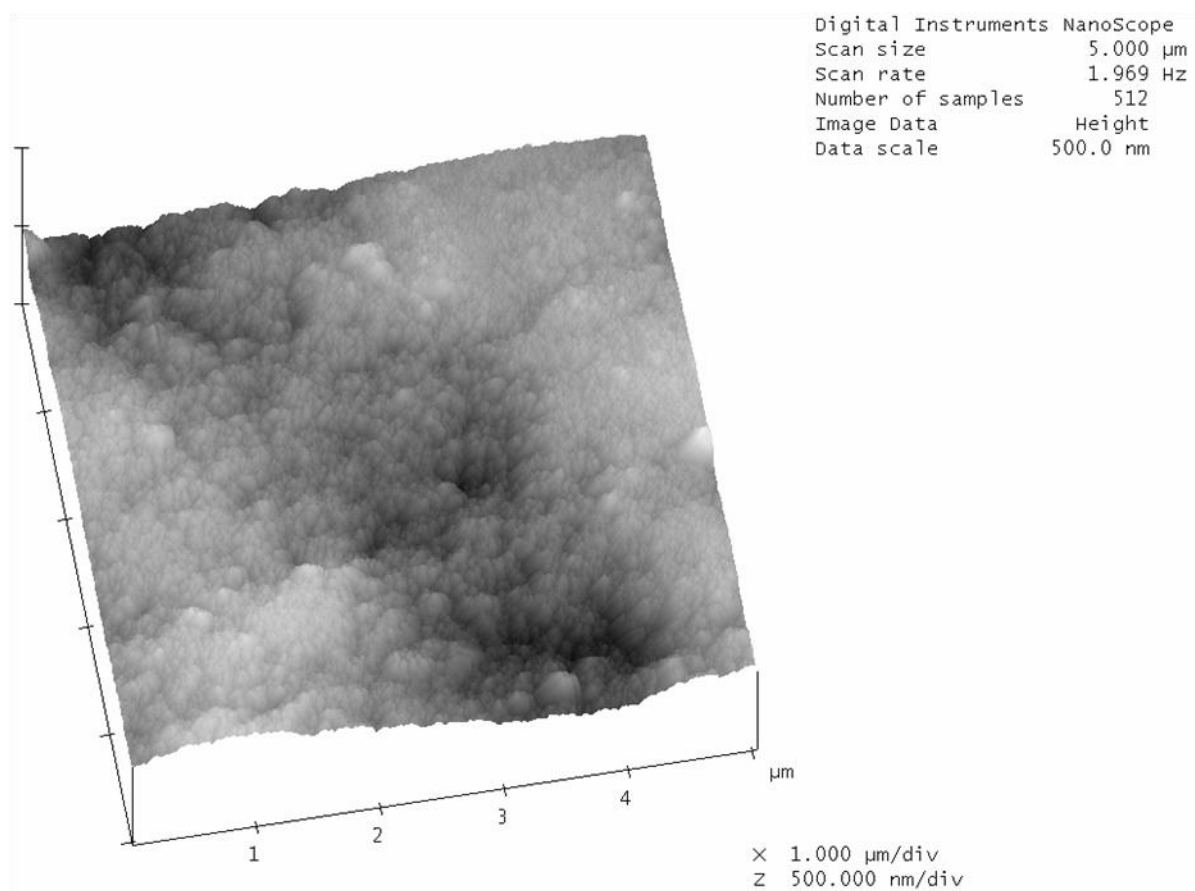
man durch Wahl der Messpunkte zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen kommen. In Abb. 4.2.6.3 liegen diese sehr nah zusammen an einer Art „Peak“, was zu einer sehr glatten Verbindungslinie zwischen beiden Punkten und damit zu einem extrem kleinen durchschnittlichen Rauigkeitswert  $R_a$  von fast null führt.



**Abb. 4.2.6.3:** AFM-Datensatz eines ungeätzten Zahns mit Höhenprofillinie (oben), dem aufgenommenen Bild (unten) und den dazugehörigen Werten (rechts).

Gerade solche Sprünge mit glatten Kanten im Profil deuten aber auf Messartefakte hin, bei denen die Nadel möglicherweise seitlich gegen ein Hindernis gestoßen ist, sich deshalb relativ schnell nach oben bewegt und somit die exakte Textur nicht aufnehmen kann. Würde man einen der beiden Punkte zwischen denen die Rauigkeit bestimmt wird, auf eine der Erhöhungen weiter links in der Linie legen, so wäre der durchschnittliche Rauigkeitswert ein vollkommen anderer.

Natürlich ändert sich nichts an der allgemeinen Aussage, dass der geätzte Bereich rauer ist als der ungeätzte, was man in Abb. 4.2.6.4 noch einmal erkennen kann. Dort zieht sich ein flacher breiter Graben durchs Bild, die Höhe der z-Achse beträgt nur 500 nm, wohingegen diese bei Abb. 4.2.6.2 2000 nm beträgt und dort die Texturen trotzdem stärker ausgeprägt sind.



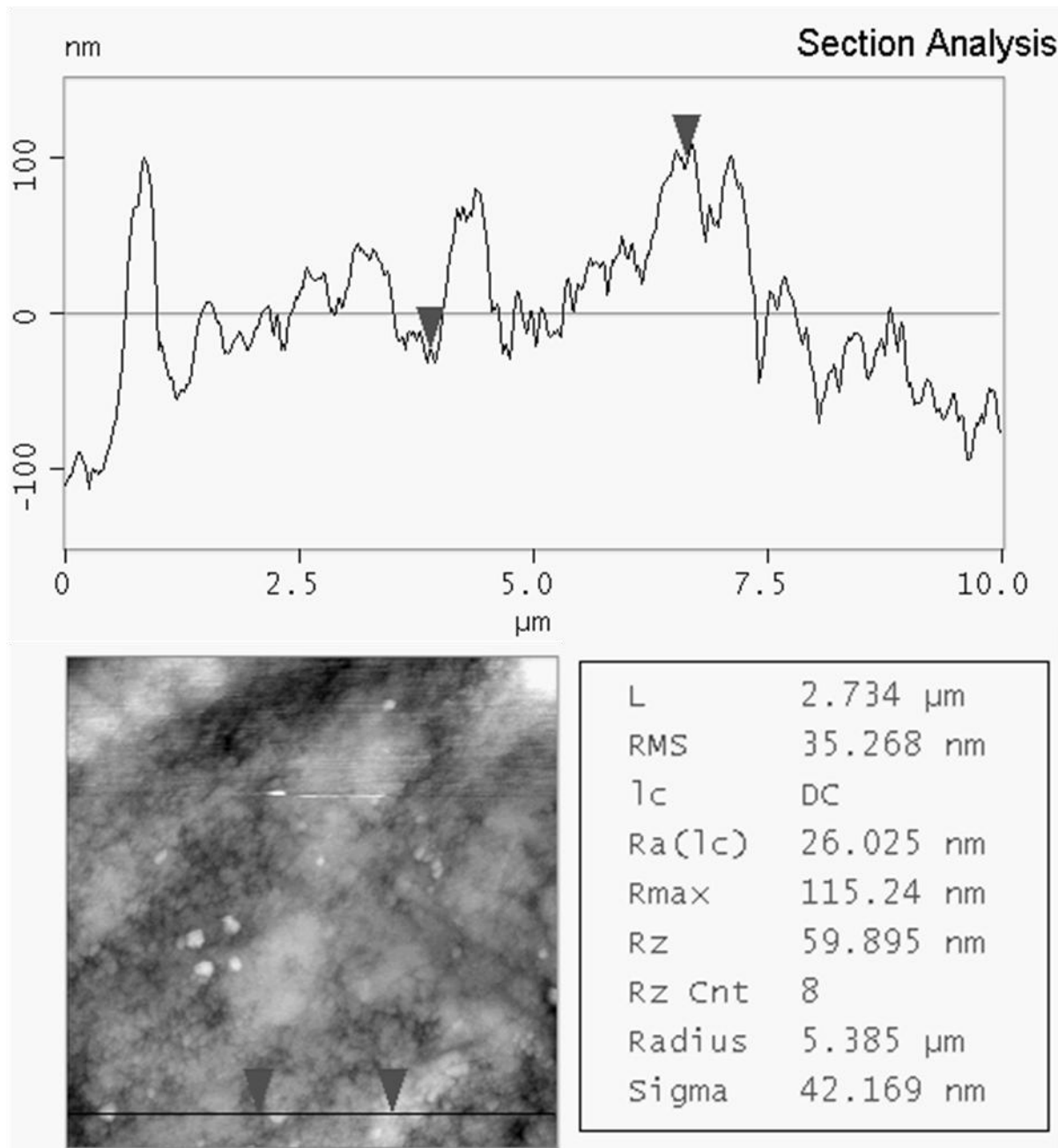
**Abb. 4.2.6.4:** Vergrößerung und dreidimensionale Darstellung der AFM-Aufnahme in Abb. 4.6.2.3

Qualitativ lässt sich also leicht der klare Vergleich ziehen, quantitative Aussagen hängen jedoch sehr stark vom Ort der jeweiligen Messung bzw. selbst dann von den genauen Messpunkten ab.

Natürlich könnte man die Rauigkeit Zeile für Zeile berechnen und damit die gesamten Oberfläche praktisch integrieren, was zwar einen großen Rechenaufwand bedeuten, aber prinzipiell funktionieren würde. Man würde dann jedoch automatisch jedes Messartefakt mit berechnen, was man durch willkürliches Legen der Profillinie zu vermeiden versucht.

Solche Artefakte lassen sich bei dieser Art der Messung nicht vermeiden, bei der ein Gerät, das für die Untersuchung sehr flacher Oberflächen mit nur geringen Abweichungen konstruiert wurde, für Untersuchungen an biologischen Proben, die verhältnismäßig uneben sind, verwendet wird.

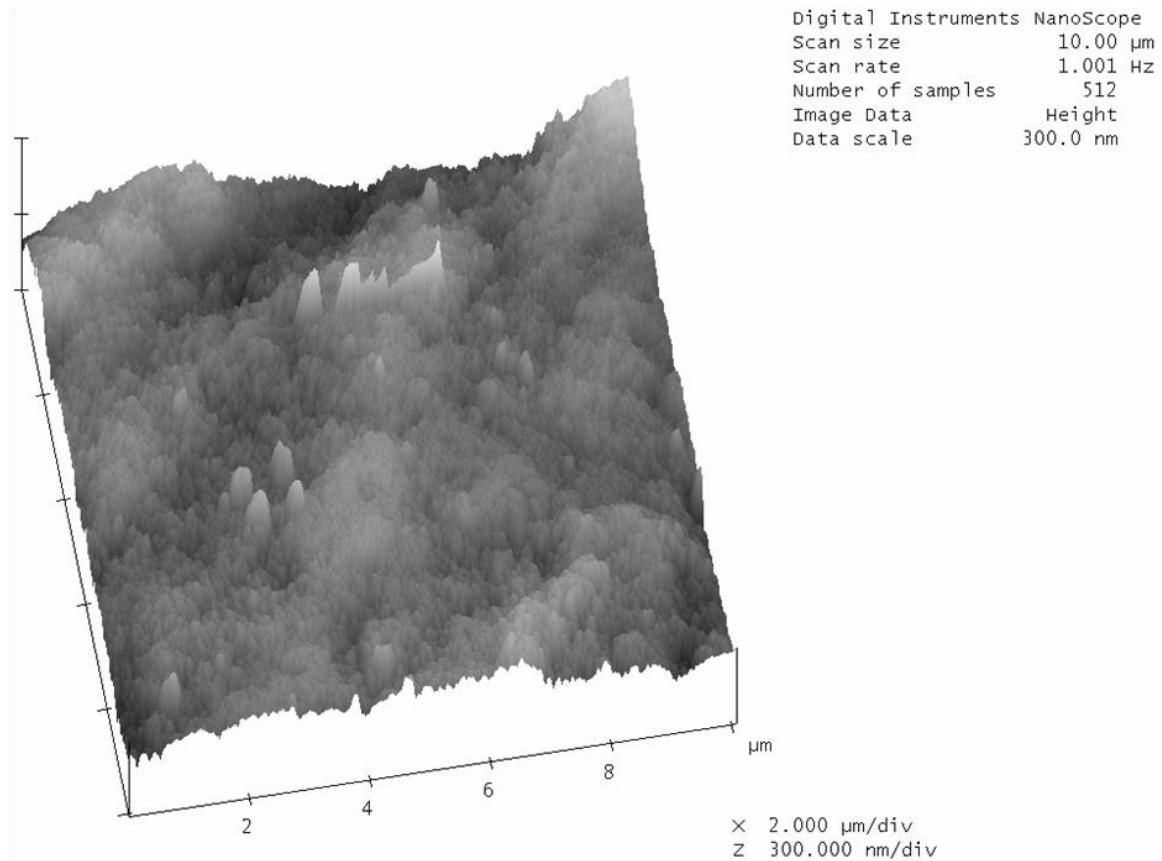
Ein letztes Beispiel soll die vorangegangene Erklärung noch einmal verdeutlichen. In Abb. 4.2.6.5 und 6 ist eine andere Stelle des ungeätzten Bereichs gezeigt, die etwas rauer erscheint, bei der allerdings die z-Achse mit 100 nm bei der Höhenprofillinie und 300 nm bei der dreidimensionalen Darstellung noch kleiner ist als bei der vorangegangenen ebenfalls ungeätzten Stelle. Trotzdem wird mit  $R_a = 26$  nm eine wesentlich höhere Rauigkeit zwischen den beiden gewählten Messpunkten errechnet, da zwischen diesen auch mehrere Erhebungen liegen. Hätte man erneut zwei nahe beieinander liegende Punkte beispielsweise am linken Rand der Höhenprofillinie gewählt, so wäre trotz des größeren Höhenunterschieds eine ähnlich niedrige Rauigkeit wie bei Abb. 4.2.6.3 errechnet worden. Im oberen mittleren Teil der Abb. 4.2.6.6 sind auch erneut Messartefakte zu sehen, die wie eine extrem dünne Bergkette erscheinen. Sie sind aber praktisch zweidimensional, haben also keine Tiefe und sind somit als nicht real zu bewerten. Bei einer kompletten Integration der Oberfläche würden sie jedoch einen merklichen Beitrag liefern.



**Abb. 4.2.6.5:** AFM-Datensatz ungeätzter Zahn (2) mit Höhenprofillinie (oben), dem aufgenommenen Bild (unten) und den dazugehörigen Werten (rechts)

Wie schon angesprochen misst das verwendete Gerät zu fein, um wirklich verlässliche 3D-Oberflächen zu erhalten, die recht unebenen Proben führen auch oft zu vollkommen unbrauchbaren Messungen oder sogar Zerstörungen der Messnadel. Dies geschieht dann, wenn die Nadel beim Abrastern einer Zeile auf ein so hohes Hindernis stößt, dass sie nicht schnell genug nach oben darüber

hinweg wandern kann und sie damit durch mechanische Überlastung abbricht oder durch Verunreinigung unbrauchbar wird.



**Abb. 4.2.6.6:** Vergrößerung und 3D-Darstellung des AFM-Bilds in Abb. 4.2.6.5

Verunreinigungen werden zum Problem, da die Nadel möglichst klein hergestellt wird, um eine möglichst hohe Auflösung zu erreichen. Für die Spitzen der Nadeln sind Größen bis unter 10 nm erreichbar, was erklärt, dass selbst minimale Anhaftungen die Geometrie der Spitze stark verändern und somit die Wechselwirkung mit der Probenoberfläche beeinflussen.



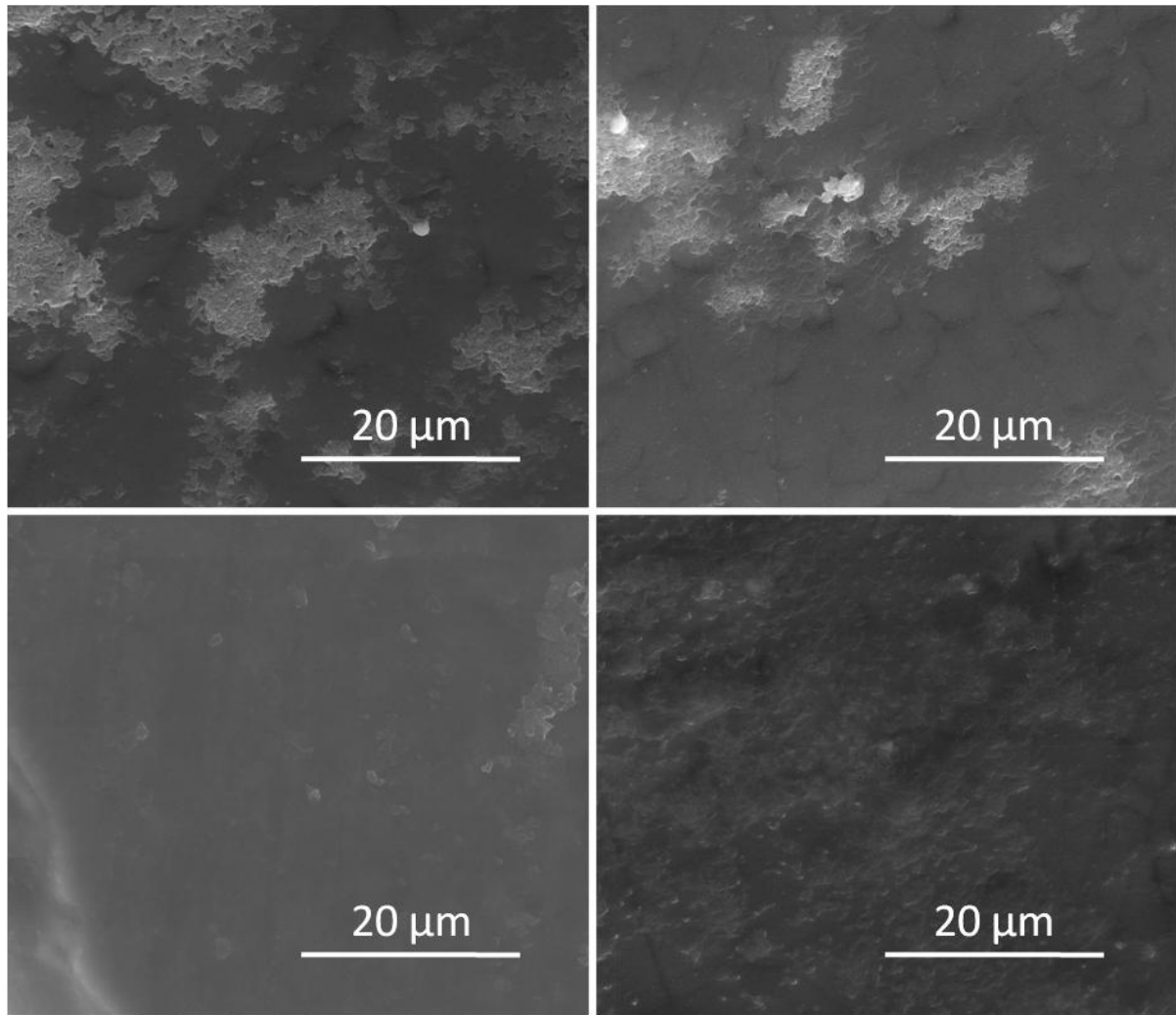
#### 4.2.7 Untersuchungen an gebleichten Zähnen

Schon seit Jahrzehnten<sup>[70]</sup> werden chemische Bleichmittel<sup>[71]</sup> zur Aufhellung von Zähnen eingesetzt, die Folgen solcher Behandlungen werden ebenfalls schon seit langem untersucht<sup>[72]</sup>. Das sogenannte *Bleaching* wird sowohl von professionellen Zahnärzten, als auch von Laien zu Hause durchgeführt<sup>[47,73]</sup>, was das Risiko unsachgemäßer Anwendung steigert. Manche Studien deuteten auf eine Unbedenklichkeit<sup>[74]</sup> der Methode hin, es wurden jedoch auch Einflüsse auf die Mikrohärté<sup>[75]</sup>, den Mineralisationsgrad<sup>[76]</sup> und die Oberflächenmorphologie<sup>[72]</sup> festgestellt.

Nach den im Rahmen dieser Dissertation vorangegangenen Untersuchungen von durch Phosphorsäure angeätzten Zähnen sollte überprüft werden, ob mit den eingesetzten Methoden ebenfalls Einflüsse eines Bleichmittels auf Zahnoberflächen festgestellt werden konnten. Von besonderem Interesse war dabei eine dreidimensionale Darstellung, die auf diesem Gebiet noch nicht sehr häufig publiziert wurde, wahrscheinlich wegen ähnlicher Probleme wie bei den zuvor beschriebenen geätzten Zähnen.

Es wurden bereits nach zahnmedizinischem Standardverfahren gebleichte Zähne vom Projektpartner Dr. Ljubisa Markovic von der Universität Witten/Herdecke erhalten und zuerst im ESEM-Modus untersucht.

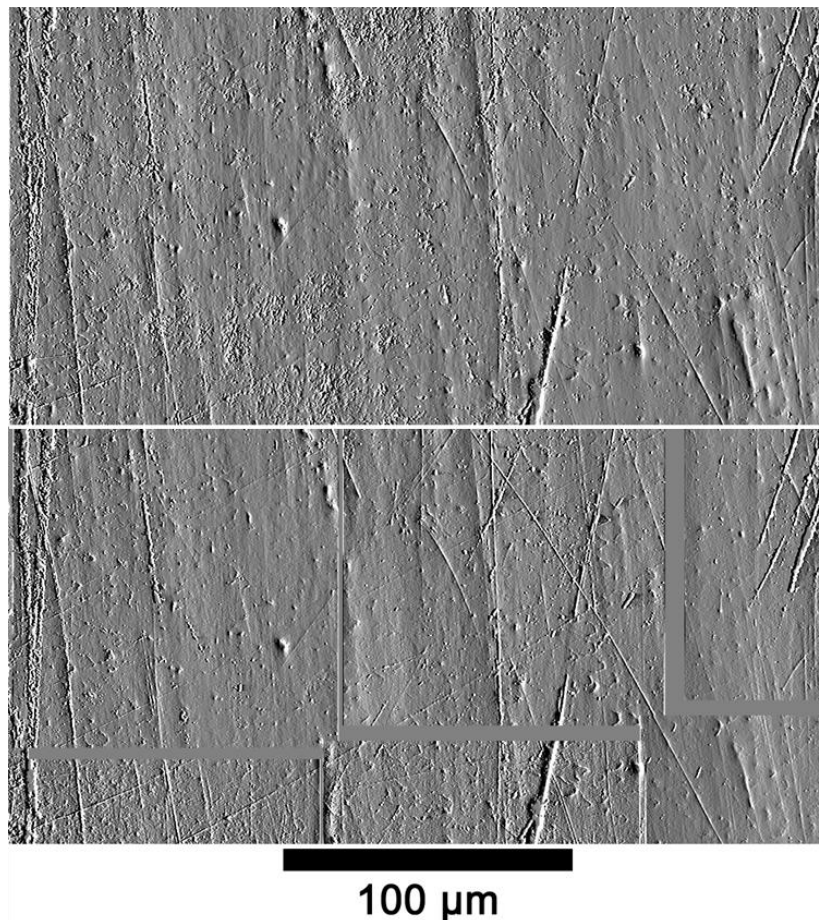
In Abb. 4.2.7.1 sind einige beispielhafte Ergebnisse gezeigt, aus denen hervorgeht, dass geätzter (rechts) und ungeätzter Bereich (links) nicht immer gut zu unterscheiden sind. Die beiden oberen Bilder sehen sich recht ähnlich, obwohl sie aus verschiedenen Bereichen stammen, die beiden unteren Bilder unterscheiden sich deutlich. Da der Zahn relativ ungenau markiert war, konnte nicht absolut sicher gesagt werden, dass man Aufnahmen im jeweils erwarteten Bereich machte, die Zahnoberfläche war jedenfalls nicht sehr deutlich angegriffen. Außerdem konnte nicht ausgeschlossen werden, dass vermeintliche Ätzspuren auf einem Zahn nicht bereits durch Prozesse im Mund eines Spenders entstanden waren, denn schließlich handelte es sich um explantierte Zähne.



**Abb. 4.2.7.1:** Links ungebleichte, rechts gebleichte Zahnoberfläche; oben nur geringe Unterschiede sichtbar, unten rechts deutliche Abnutzungsspuren

Aus diesem Grund wurde ein anderes AFM-Gerät (Autoprobe CP Research, Fa. ThermoMicroscopes / Veeco Instruments) als zuvor eingesetzt. Dieses Gerät des Arbeitskreises Prof. Hasselbrink konnte größere Flächen abrastern und war weniger empfindlich, sodass Höhenunterschiede von mehreren Mikrometern nicht automatisch zu Messfehlern führten. Durch eine spezielle Befestigung konnte dafür gesorgt werden, dass jeweils gleiche Bereiche auf der Probenoberfläche betrachtet wurden. Ein Areal konnte so vor und nach Einsatz des Bleichmittels abgerastert werden.

Nachdem bei Versuchen mit kurzer Bleichzeit keinerlei Veränderung an den Zahnoberflächen beobachtet werden konnte, wurde die Bleichlösung zwanzig Stunden lang auf eine vorher charakterisierte Stelle aufgebracht.

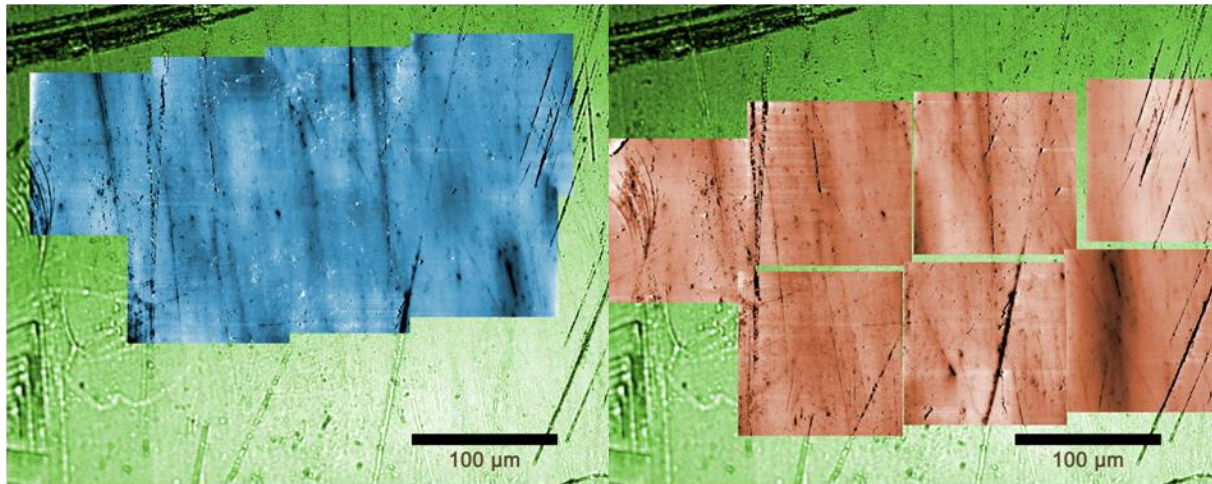


**Abb. 4.2.7.2:** Oberflächentopographie eines Zahnbereichs vor (oben) und nach (unten) zwanzigstündiger Behandlung mit Bleichlösung

Bei Abb. 4.2.7.2 handelt es sich um Oberflächentopographien eines 20 Stunden lang gebleichten Bereichs vor (oben) und nach (unten) der Behandlung. Es sind praktisch keine Unterschiede erkennbar, die grauen Balken auf unterem Bild resultieren aus fehlerhaften Übergängen zwischen aufgenommenen Einzelbildern. Nach der Behandlung sind unten vielleicht etwas weniger Ablagerungen auf der Zahnoberfläche sichtbar.

Auch zusammengestellte Kombinationen aus lichtmikroskopischen und AFM-Aufnahmen wie in Abb. 4.2.7.3 zeigten keine Veränderung des Zahnschmelzes.

Das grün unterlegte Bild wurde dabei mit dem Lichtmikroskop aufgenommen, die andersfarbigen Einzelbilder sind AFM-Aufnahmen.

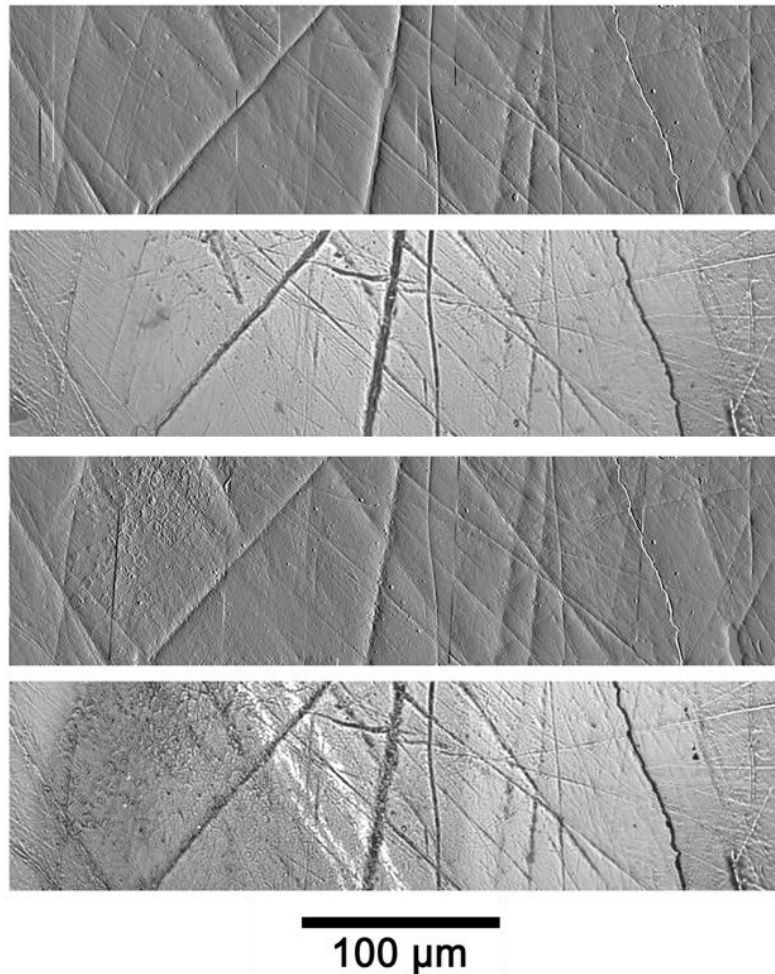


**Abb. 4.2.7.3:** Kombination aus lichtmikroskopischen und AFM-Bildern vor (links) und nach (rechts) Bleichung; keine Wirkung zu erkennen

Um auszuschließen, dass ein methodischer Fehler vorlag, wurden erneut Zähne mit der Phosphorsäurepaste geätzt, die schon in vorigen Versuchen eingesetzt wurde. Abb. 4.2.7.4 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs.

Die beiden oberen Bilder in Abb. 4.2.7.4 zeigen die unbehandelte Enamelschicht, die nach Ätzung wie auf den unteren beiden Bildern zu erkennen deutlich aufgeraut ist. Im untersten Bild ist die Grenze zwischen geätztem und ungeätztem Bereich wie eine Schattenlinie gut zu erkennen.

Die Methode war also zur Abbildung der gesuchten Strukturen geeignet.



**Abb. 4.2.7.4:** AFM-Aufnahmen eines mit Phosphorsäurepaste geätzten Zahns; die oberen beiden Bilder zeigen die ungeätzte Oberfläche, die unteren beiden Bilder den gleichen Ort nach der Ätzung (linker Bereich)

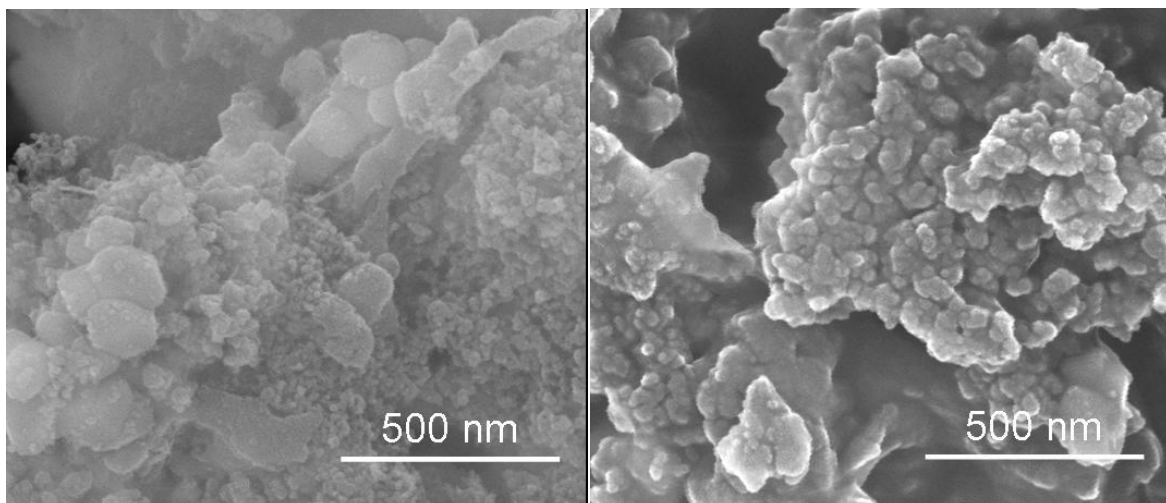
#### **4.2.8 Untersuchung Nanopartikelhaltiger Zahncremes zur Reparatur von Defekten im Zahnschmelz**

Durch Abbau von Zahnschmelz über längere Zeiträume oder Rückgang des Zahnfleisches kommt es bei immer mehr Menschen zu einer Freilegung des schmerzempfindlichen Zahnbeins. Dieses wird von mikroskopisch kleinen Kanälen, Dentintubuli genannt, durchzogen, die Reize durch Wärme, Kälte, süße oder saure Speisen direkt zum Nerv transportieren können. An der Zahnoberfläche haben diese Kanäle einen Durchmesser von 1-2 μm in der Nähe der Pulpa erweitern sie sich auf 3-4 μm<sup>[77]</sup>

Neuartige Zahncremes wie nanosensitive hca von miradent und SOS sensitiv von Theramed sollen in der Lage sein, eine Art Schutzschicht auf die Zahnoberfläche aufzubringen und offenliegende Dentintubuli zu „versiegeln“.

Die festen Bestandteile dieser Zahncremes wurden im Rahmen dieser Arbeit mit verschiedenen Methoden untersucht, um eine Aussage über die Tauglichkeit für die genannte Aufgabe treffen zu können.

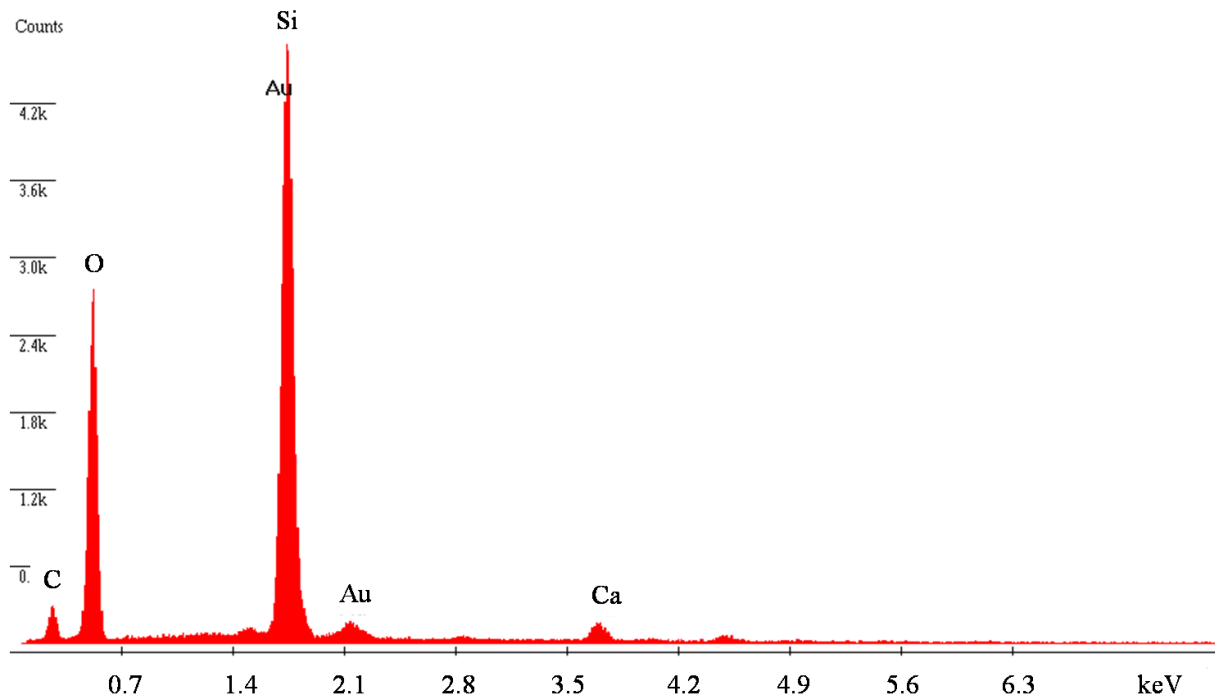
Dazu wurden zuerst 26.4 mg der Zahncreme nanosensitive hca aus einer frisch geöffneten Tube entnommen und in 10 g Reinstwasser dispergiert. Anschließend wurde die Suspension 30 Minuten lang bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, wobei 2.5 mg Feststoff erhalten wurden. Von diesem wurden REM-Aufnahmen gemacht und ein EDX-Spektrum gemessen.



**Abb. 4.2.8.1:** REM-Aufnahmen des abzentrifugierten Feststoffs der Zahncreme nanosensitive hca; Nanopartikel von 100-200 nm Durchmesser sind zu erkennen

Abb. 4.2.8.1 zeigt aggregierte Nanopartikel verschiedener Größe hauptsächlich im Bereich 100-200 nm. Nimmt man an, dass diese Partikel vor Zentrifugation und Trocknung noch nicht aggregierten, gab es prinzipiell die Möglichkeit, dass sie sich in offene Dentintubuli einlagerten. Das EDX-Spektrum in Abb. 4.2.8.2 zeigt, dass die Partikel vor allem aus Siliziumdioxid bestehen und geringe Mengen Calcium enthalten. Nach Herstellerangaben sollte auch Titandioxid der Modifikation Anatas in der Zahncreme enthalten sein, dies konnte jedoch nicht

bestätigt werden. Vielleicht gingen die Partikel bei der Zentrifugation aufgrund eines zu kleinen Durchmessers verloren. Der hohe Siliziumanteil spricht zwar nicht für einen dem Zahnmineral sehr ähnlichen Stoff, das Vorhandensein von Calcium könnte jedoch die Remineralisation erleichtern.

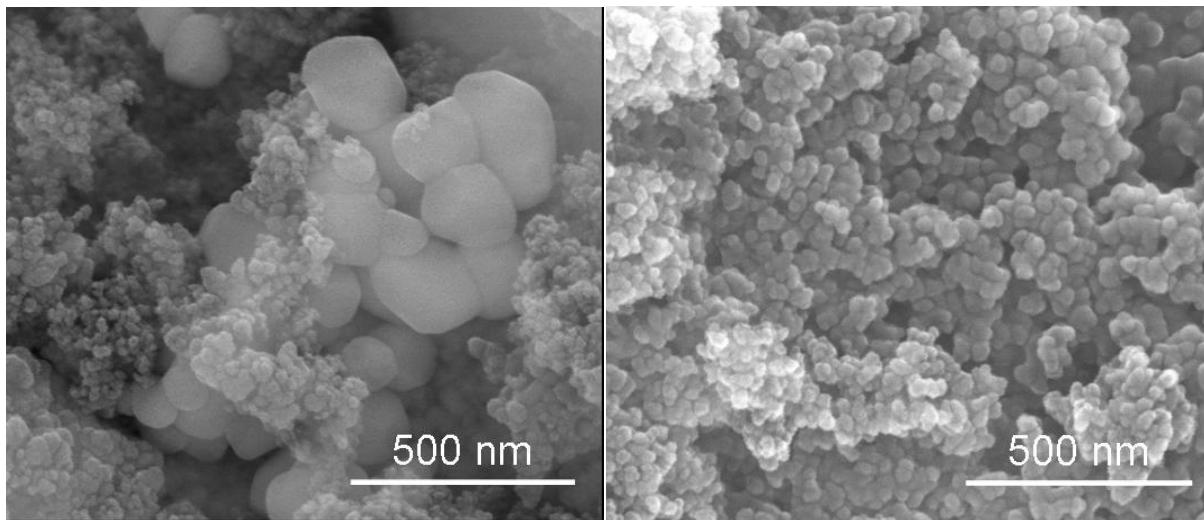


**Abb. 4.2.8.2:** EDX-Spektrum des Feststoffs der Zahncreme nanosensitive hca; Hauptbestandteile Silizium und Sauerstoff, geringe Mengen Calcium; ebenfalls vorhanden sind Gold vom Sputtern und Kohlenstoff vom Probenkleber

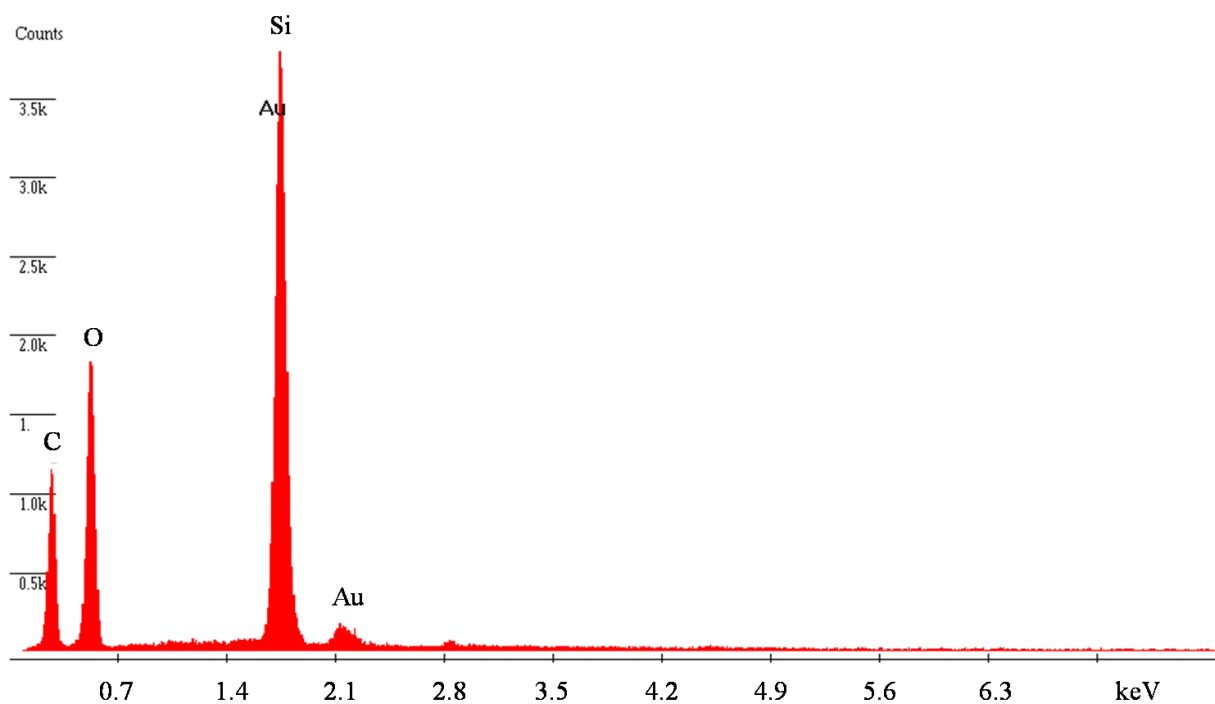
Von der Zahncreme Theramed SOS Sensitiv wurden 24.6 g aus einer frisch geöffneten Tube entnommen, in 10 g Reinstwasser dispergiert und anschließend dreißig Minuten lang bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Es wurden 8.3 mg Feststoff erhalten, von dem REM-Aufnahmen und EDX-Spektren angefertigt wurden.

In Abb. 4.2.8.3 erkennt man, dass der Feststoff einen hohen Anteil von Partikeln mit einer Größe unter 100 nm beinhaltet, jedoch gleichzeitig auch wesentlich größere Partikel von 300 nm vorhanden sind. Die Teilchen sind jedoch noch in einem Größenbereich, die es prinzipiell möglich machen, sich in Dentintubuli einzulagern.





**Abb. 4.2.8.3:** REM-Aufnahmen des abzentrifugierten Feststoffs der Zahncreme Theramed SOS Sensitiv; Nanopartikel von unter 100 nm bis 300 nm Durchmesser sind zu erkennen



**Abb. 4.2.8.4:** EDX-Spektrum des Feststoffs der Zahncreme Theramed SOS Sensitiv; die Partikel bestehen ausschließlich aus Silizium und Sauerstoff; Gold und Kohlenstoff stammen erneut vom Sputtern und vom Probenkleber

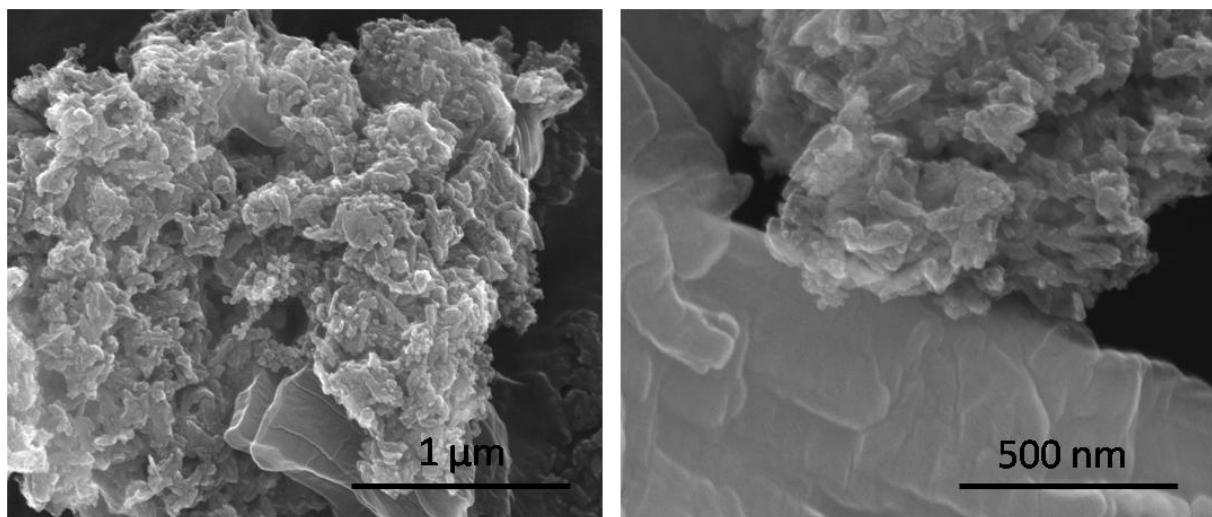
Das in Abb. 4.2.8.4 gezeigte EDX-Spektrum von Theramed SOS Sensitiv ähnelt dem in Abb. 4.2.8.2 gezeigten Spektrum von nanosensitive hca mit der Ausnahme, dass ausschließlich Silizium und Sauerstoff detektiert werden und



kein Calcium. Dies kann bedeuten, dass die vom Hersteller angegebenen Calciumphosphat-Nanopartikel zu klein zum Abzentrifugieren sind, ebenso wie Anataspartikel, die laut Hersteller enthalten sein sollten.

Zusätzlich zu den Zahncremes wurde noch eine Zahn- und Mundspüllösung von Biorepair® untersucht, die neben Hydroxylapatit auch antibakteriell wirkendes Zink zur Vermeidung von Mundgeruch und Zahnstein enthält.

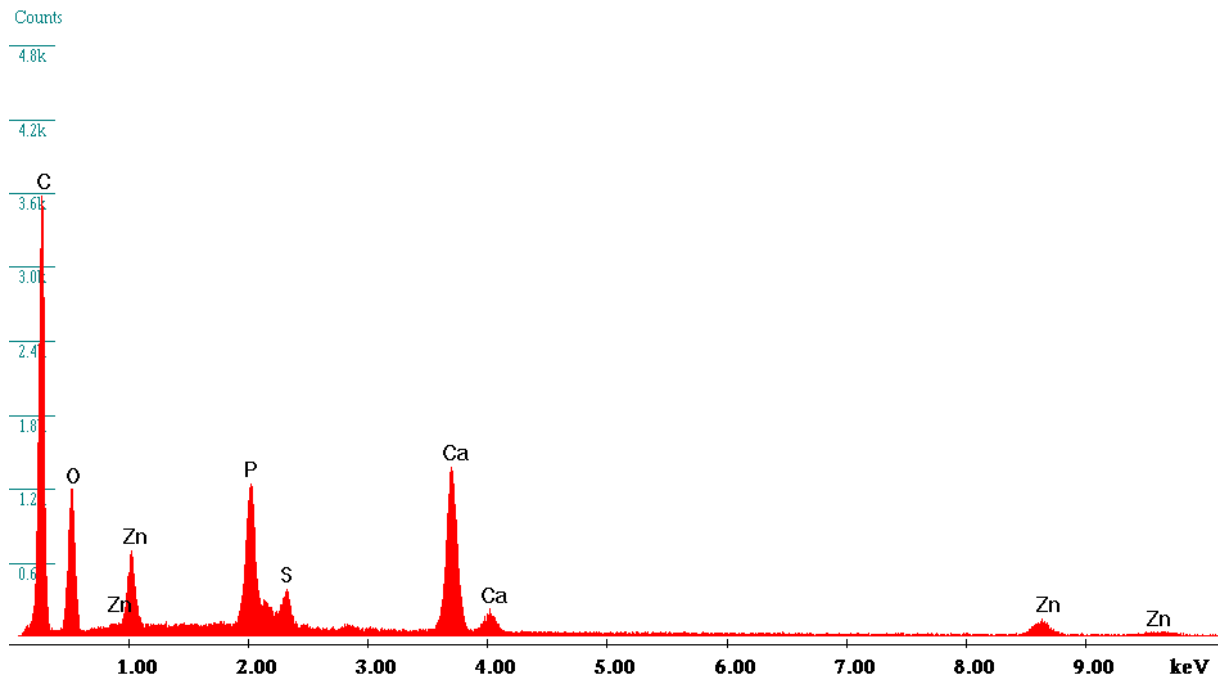
50 mL der Lösung wurden einer frisch geöffneten Flasche entnommen und in 500 mL Reinstwasser gelöst, anschließend wurden 200 mL der Lösung 10 Minuten bei 10.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, wobei 62 mg Feststoff erhalten wurden.



**Abb. 4.2.8.5:** REM-Aufnahmen des abzentrifugierten Feststoffs der Zahn- und Mundspüllösung Biorepair; aggregierte Nanopartikel unter 100 nm sind zu erkennen, allerdings auch mehrere Mikrometer-große Teilchen

Ein Teil der in Abb. 4.2.8.5 gezeigten Partikel ist wie in den Zahnpasten klein genug, um Dentintubuli möglicherweise zu verschließen, es kommen aber auch mikrometergroße Teilchen vor, bei denen es sich offensichtlich nicht um Aggregate handelt. Im EDX-Spektrum in Abb. 4.2.8.6 sind die angegebenen Elemente Calcium, Phosphor, Sauerstoff, Zink und Kohlenstoff erkennbar,

zusätzlich noch ein kleiner Anteil Schwefel. Dies spricht für Calciumphosphat und -carbonatpartikel, wie vom Hersteller angegeben.



**Abb. 4.2.8.6:** EDX-Spektrum des Feststoffs der Zahn- und Mundspüllösung Biorepair; Calcium, Phosphor, Kohlenstoff sowie Zink und geringe Anteile Schwefel sind erkennbar

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle drei untersuchten Materialien potenziell Dentintubuli verschließen und somit Zahnschmerzen durch äußere Reize vermindern könnten. Es ist jedoch nicht sicher ob und in welchem Umfang sich Nanopartikel in solchen Kanälen festsetzen; man kann jedoch davon ausgehen, dass ein Großteil ohne Ablagerung den Mund beim Ausspülen wieder verlassen wird.

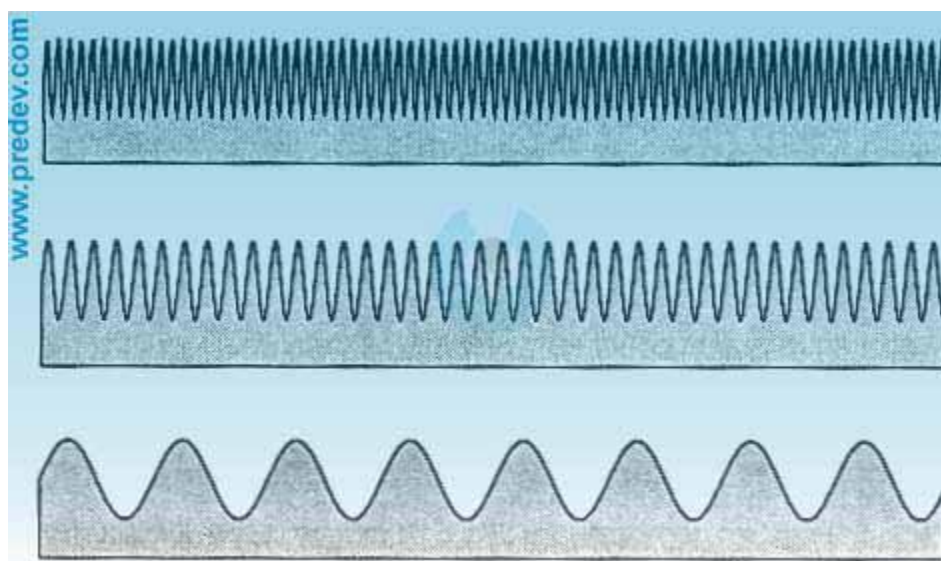
#### 4.2.9 Diskussion

Die durchgeführten Untersuchungen unterschiedlicher Art an Zähnen bestätigten die Erkenntnis, dass der Einsatz von phosphorsäurehaltiger Ätzpaste zu einem irreversiblen Verlust an der Enamelschicht<sup>[78]</sup> führt. Es tritt ein retentives Muster der Schmelzoberfläche auf, das zur mikromechanischen Verankerung<sup>[79]</sup> ausgenutzt werden kann, wie z.B. bei Zahnfüllungen oder Brackets für Zahnspangen.

Eine dreidimensionale Betrachtung der durch Aufrauung vergrößerten Oberfläche ist dabei von besonderem Interesse, und es wurde mittels 3D-Rekonstruktion aus gekippten rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie AFM-Messungen versucht, diese näher zu bestimmen.

Die Ergebnisse der 3D-Rekonstruktionen bestätigten qualitativ die Annahmen, die Ungenauigkeit der Methode ließ jedoch keine quantitativen Aussagen zu. Die AFM-Methode lieferte zwar realistischere Oberflächenprofile, die jedoch auch nicht frei von Fehlern waren. Angegebene Rauigkeitswerte hingen stark vom Ort der Messung ab.

Allgemein ist festzuhalten, dass die oft bemühte durchschnittliche Rauigkeit  $R_A$  eine Oberfläche weniger gut beschreibt als angenommen:



**Abb. 4.2.9.1:** Drei durchaus unterschiedliche Oberflächen, die alle den gleichen Wert für  $R_A$  besitzen.

Es müssten wesentlich komplexere Oberflächenparameter bestimmt werden, um geätzten Zahnschmelz auf einen Zahlenwert zu reduzieren, was wiederum sehr genaue Messungen der Oberflächentopographie erfordern würde.

Aus diesem Grund werden Veränderungen an der Enamelschicht und die daraus resultierenden Folgen wie z. B. Schmelzbrüche<sup>[80]</sup> üblicherweise eher gemessen als berechnet. Mit genaueren Messmethoden wäre es prinzipiell möglich, umfangreichere Rechnungen anzustellen und deren Ergebnisse mit praktischen Messergebnissen zu vergleichen, im Rahmen dieser Dissertation konnten jedoch lediglich Erwartungen bestätigt werden.

Dies galt auch für die bei durchgeführten Messungen nicht gefundene Schädigung einer Zahnoberfläche durch Bleichmittel. Es gibt zwar eine große Anzahl von Arbeiten, die von Risiken dieser Behandlung berichten, es gibt allerdings ebenfalls sehr viele Veröffentlichungen, die deren Unbedenklichkeit propagieren. Mit den hier verwendeten Methoden konnte kein Einfluss selbst bei unnatürlich langer Bleichung festgestellt werden, so dass aus Sicht der Ergebnisse nichts gegen den Einsatz des *Bleaching* beim Menschen spricht.

Untersuchungen an zwei Zahnpasten und einer Spüllösung, die alle die Schmerzempfindlichkeit von Zähnen reduzieren sollen, haben ergeben, dass dies prinzipiell möglich ist. Die enthaltenen Nano- bzw. Mikropartikel liegen jeweils in einem Größenbereich, der ein Verschließen offener Dentintubuli potenziell ermöglicht. Diese offenliegenden Kanälchen setzen sich durchs Dentin bis zum Nerv fort und können so Reize weiterleiten, die von einer intakten Enamelschicht abgehalten werden würden. Ein echtes Wiederherstellen der Enamelschicht vermögen die untersuchten Zahnpasten und Spüllösungen sicher nicht zu leisten. Wiederholte Anwendung könnte jedoch die Schmerzempfindlichkeit von Zähnen reduzieren, einerseits indem die Dentintubuli zumindest teilweise verschlossen werden, andererseits durch eine verbesserte Remineralisation des Zahngewebes durch die in den Partikeln enthaltenen Elemente wie Calcium und Phosphor.

### **4.3 In-vitro Untersuchungen an beim Menschen eingesetzten Phosphatbindern**

#### **4.3.1 Einleitung**

Unter Dialysepatienten ist die Sterblichkeitsrate unter anderem aufgrund von kardiovaskulären Erkrankungen extrem hoch<sup>[81]</sup>, 10 Jahre nach Beginn der Behandlung liegt sie bei 80 %<sup>[82]</sup>, im Endstadium der Niereninsuffizienz überlebt ein Großteil der Patienten sogar nur noch 2 Jahre. Störungen im Calcium- und Phosphatmetabolismus wurden als eine wichtige Ursache dafür identifiziert<sup>[83-85]</sup>. Die sogenannte Hyperphosphatämie führt zur langsamen Calcifizierung von Gefäßen<sup>[86]</sup> und damit zu Schlaganfällen, Herzinfarkten und anderen potenziell tödlichen Erkrankungen.

Phosphatbinder werden daher beim Menschen seit Jahrzehnten<sup>[87,88]</sup> zur Senkung des Serumphosphatspiegels verabreicht. Da die zu Beginn eingesetzten Medikamente auf Aluminiumbasis und auch die später verwendeten calciumhaltigen Präparate nicht frei von Nebenwirkungen sind, wurden in den 1990er Jahren die Wirkstoffe Lanthancarbonat und poly(Allylamin)hydrochlorid bzw. Sevelamer<sup>®</sup> eingeführt<sup>[89]</sup>.

Um die verschiedenen Arten von Phosphatbindern zum ersten Mal unter vergleichbaren Bedingungen zu untersuchen, wurde eine Anlage entworfen und gebaut, die den menschlichen Magen-Darmtrakt simulieren sollte.

Für die Versuchslösungen wurden Phosphatkonzentrationen von 3 und 6 mmol L<sup>-1</sup> gewählt, wobei es sich um realistische Werte bei chronischer bzw. terminaler Niereninsuffizienz handelt<sup>[90,91]</sup>. Durch den deutlichen Unterschied zwischen beiden Werten sollte festgestellt werden, ob die Phosphatbindekazität der untersuchten Wirkstoffe von der Konzentration an Phosphat abhängt, was zuvor in einzelnen Studien gezeigt wurde<sup>[92]</sup>.

### 4.3.2 Eingesetzte Phosphatbinder und Chemikalien

Es wurden folgende Phosphatbinder eingesetzt, die alle zum Zeitpunkt der Studie bereits für den Menschen zugelassenen waren:

Antiphosphat<sup>®</sup>, produziert von GRY-Pharma in Kirchzarten, Deutschland. Aktiver Bestandteil waren 600 mg Aluminiumhydroxidgel ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ). Da die genaue Zusammensetzung jedoch nicht angegeben war, wurde der Aluminiumanteil von 212 mg pro Tablette mittels AAS bestimmt.

Calciumacetat-Nefro<sup>®</sup> von MEDICE in Iserlohn, Deutschland. Aktiver Bestandteil waren 700 mg Calciumacetat ( $\text{Ca}(\text{OOCCH}_3)_2$ ) pro Tablette.

Calciumcarbonat<sup>®</sup> von Fresenius Medical Care in Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland. Aktiver Bestandteil waren 500 mg Calciumcarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) pro Tablette.

Fosrenol<sup>®</sup> von Shire Pharmaceutical Contracts Ltd. in Basingstoke, Großbritannien. Aktiver Bestandteil waren 750 mg Lanthanarbonat ( $\text{La}_2(\text{CO}_3)_3$ ) pro Tablette.

Renagel<sup>®</sup> von Genzyme Europe B.V., Niederlande. Aktiver Bestandteil waren 800 mg poly(Allylamin)hydrochlorid bzw. Sevelamer<sup>®</sup> pro Tablette. Zur Berechnung der theoretischen Phosphatbindekazapazität wurde der Chlorgehalt von  $148.4 \pm 1.5$  mg pro Tablette potentiometrisch mit einem Metrohm 716 DMS Titrino bestimmt. Zuvor wurden die Tabletten nach der Schöninger Methode aufgelöst und mit 0.01 M  $\text{AgNO}_3$  titriert.

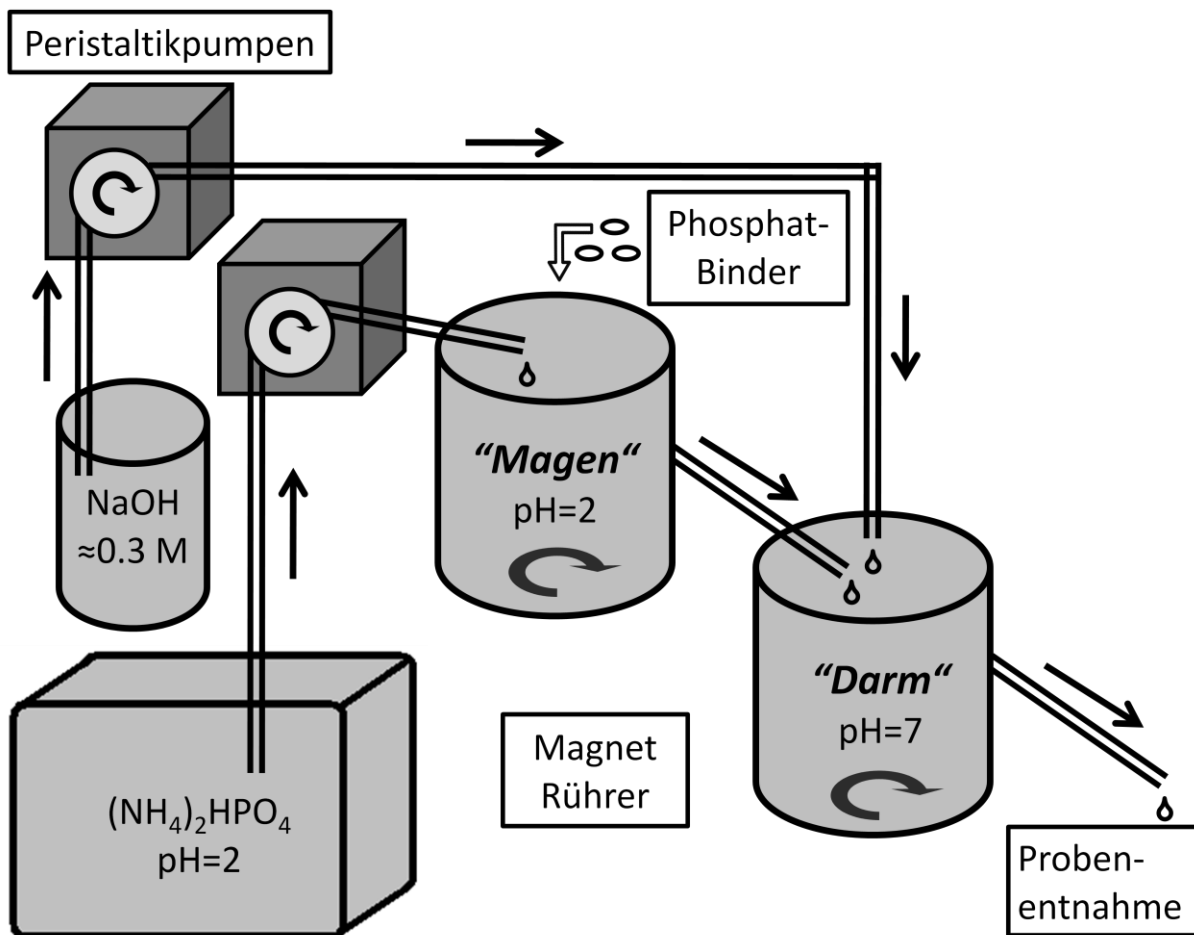
Alle Phosphatbinder wurden aus frisch geöffneten Packungen entnommen und sofort eingesetzt, nur Fosrenol wurde grob zerstoßen, da es sich um eine Kautablette handelte. Die Dosis bzw. Anzahl an Tabletten pro Versuch richtete sich nach Herstellerangaben und der Roten Liste<sup>®[93]</sup>.

Zum Vergleich wurden soweit möglich Versuche mit den Reinsubstanzen der aktiven Bestandteile durchgeführt. Dazu wurden Calciumcarbonat (Calcit) von Riedel-de-Haen, Calciumacetat von Merck und Aluminiumsulfathydrat von Raab Karcher Chemie eingesetzt. Weitere verwendete Chemikalien waren

konzentrierte Salzsäure (HCl) von Sigma-Aldrich, Diammoniumhydrogenphosphat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) von Merck und Natriumhydroxid (NaOH) von VWR Prolabo. Alle Lösungen wurden mit Reinstwasser aus einem Purelab Ultra Instrument (Elga) angesetzt.

#### 4.3.3 Apparativer Aufbau

Die im Folgenden schematisch dargestellte Anlage wurde entworfen, um den menschlichen Magen-Darm-Trakt unter Ausschluss biologischer Faktoren chemisch zu simulieren.



**Abb. 4.3.3.1:** Schematische Darstellung der Anlage zur Untersuchung von Phosphatbindekapazitäten

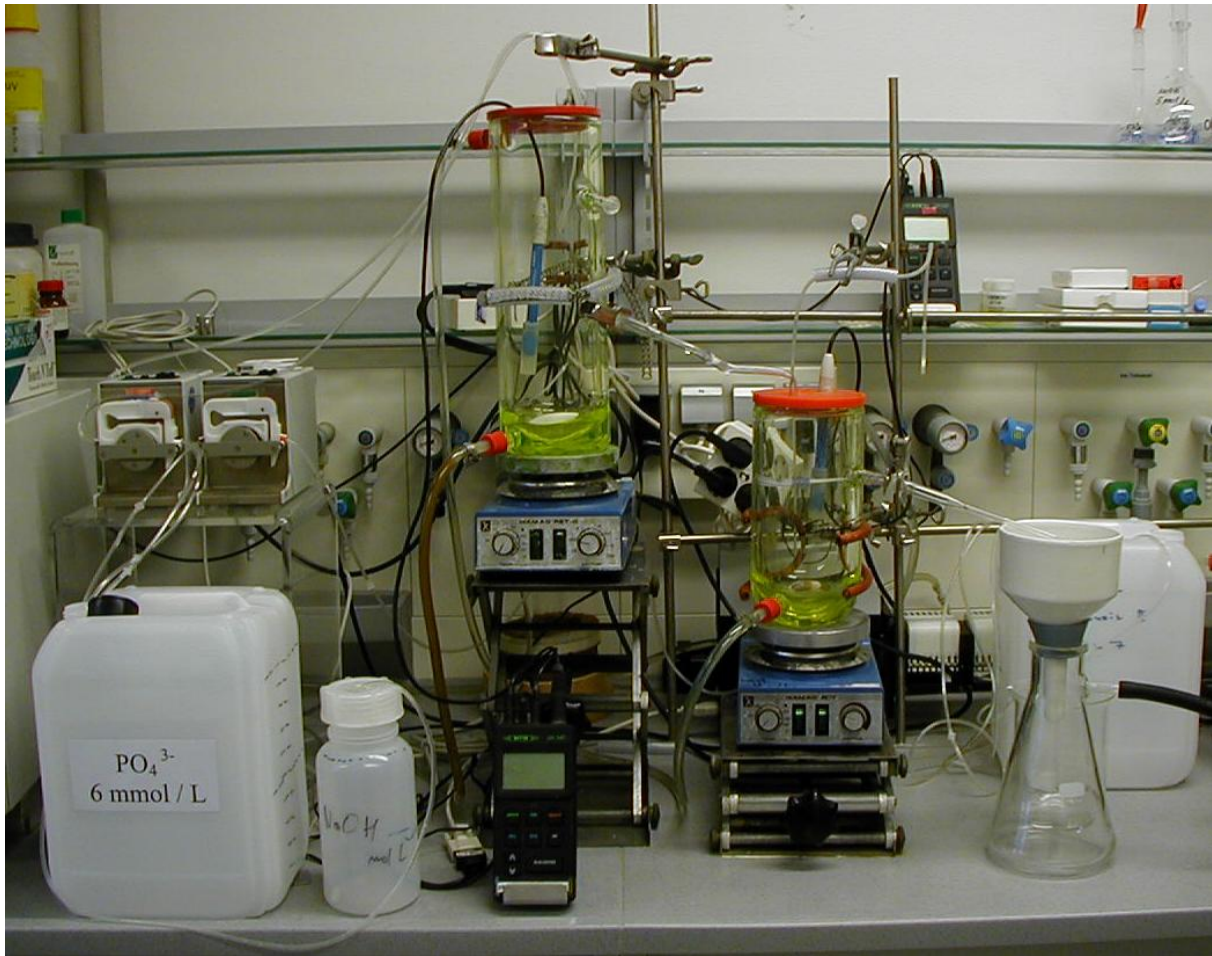
Die Anlage bestand aus zwei auf 37 °C thermostatisierten Behältern aus Glas, die über einen Überlauf verbunden waren und durch die Phosphatlösung

gepumpt wurde, die zuvor auf einen pH-Wert von 2 eingestellt wurde. Dies entspricht im Mittel dem Wert im menschlichen Magen, der im Normalfall zwischen 1 und 3 liegt<sup>[23]</sup>. Der erste Behälter soll daher im weiteren „Magen“ genannt werden, da dort ohne Phosphatbinderzugabe der pH=2 eingestellt war. War das Behältervolumen von 890 mL erreicht, so floss die weiter zuströmende Phosphatlösung über einen Überlauf in einen zweiten Behälter, der im weiteren „Darm“ genannt werden soll. In diesem wurde ein pH-Wert von 7 eingestellt, was in etwa der menschlichen Situation entspricht. Dies wurde durch konstantes Zupumpen einer etwa 0.3 M Natriumhydroxidlösung erreicht, die genau auf die Phosphatlösung abgestimmt war. Nach Überschreitung auch dieses Behältervolumens von 960 mL verließ die Lösung über einen weiteren Überlauf die Anlage, wobei die festen Bestandteile des Ausflusses mittels eines Büchnertrichters abgesaugt wurden.

Die über die Peristaltikpumpen eingestellten Flussraten der Lösungen von 886 mL h<sup>-1</sup> für die Phosphatlösung und 49 mL h<sup>-1</sup> für die Natriumhydroxidlösung wurden so gewählt, damit die Verweilzeit in „Magen“ und „Darm“ jeweils eine Stunde betragen, was in etwa der Situation im menschlichen Magen entspricht (1-5 Stunden<sup>[22]</sup>). Die Gesamtversuchsdauer betrug jeweils 7 Stunden, was ungefähr der Zeit zwischen zwei Mahlzeiten und somit der Einnahme jeweils einer Dosis der Phosphatbinder entspricht.

Die pH-Werte und Temperaturen wurden vor und während der gesamten Versuchszeit in beiden Behältern mit zwei WTW pH340 pH-Metern separat gemessen und alle 12 Sekunden auf einem angeschlossenen Computer gespeichert. Die pH-Meter mussten regelmäßig kalibriert werden, besonders die Elektrode im „Darm“ zeigte nach praktisch jedem Versuch einen Kalibrierungsbedarf, da der stundenlange Einsatz im neutralen pH-Bereich zu einem starken Ionenverlust über die Glasmembran führte.





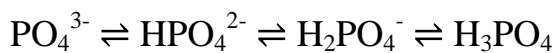
**Abb. 4.3.3.2:** Anlage zur Bestimmung von Phosphatbinderkapazitäten

#### 4.3.4 Experimentelle Durchführung

Die im Versuch benötigten 10 L Phosphat- und 1 L Natriumhydroxidlösung wurden jeweils am Vortag hergestellt, um eine vollständige Lösung der eingewogenen Edukte zu gewährleisten. Die Einwaagen wurden so gewählt, dass sich die saure Phosphat- und die basische Natriumhydroxidlösung möglichst neutralisierten, was aber nur selten auf Anhieb gelang. Dies war auch nicht anders zu erwarten, da zum Erreichen von pH=7.0 die Verhältnisse sehr genau übereinstimmen müssen und beispielsweise nicht exakt bekannt war, wieviel Wasser das sehr hygroskopische feste Natriumhydroxid vor und während der Einwaage aus der Luft aufgenommen hatte.

In der Praxis bedeutete dies, dass normalerweise die auf pH=2 eingestellte Phosphatlösung aufgrund von etwas zu wenig Natriumhydroxid nicht exakt

neutralisiert werden konnte und der pH-Wert beim Vermischen unter 7 fiel. Die basische Lösung wurde daher durch Zugabe von konzentrierter 5 M NaOH-Lösung solange aufkonzentriert, bis der pH-Wert bei der Vermischung konstant blieb. Die Einstellung des konstanten pH-Werts war bei der hohen Konzentration von  $6 \text{ mmol L}^{-1}$  aufgrund der Pufferwirkung des pH-abhängigen Systems leichter zu erreichen als bei  $3 \text{ mmol L}^{-1}$ <sup>[35]</sup>:



Waren Temperatur und pH-Wert konstant, so wurde am Auslauf der Anlage die erste Probe der Reaktionslösung genommen und danach die Tabletten in den „Magen“ fallen gelassen. Dies führte zu einem nur bei genauer Betrachtung sichtbaren kleinen Knick zu Beginn jeder pH-Kurve, da die Tabletten durch ihr Volumen wenige Milliliter saure Lösung verdrängten, die den pH-Wert im neutral eingestellten „Darm“ etwas senkten.

Die Zugabe der Tabletten markierte den eigentlichen Beginn eines jeden Versuchs, ab dem die Zeit nun gestoppt und in zehnminütigen Intervallen Proben am Auslauf der Anlage genommen wurden. Bei jeder Probennahme wurde der im Messprogramm mitlaufende Messpunkt notiert. Die festen Bestandteile der ausströmenden Lösung wurden während der gesamten Zeit mittels eines Büchnertrichters abgetrennt. Nach zwei Stunden Versuchszeit wurde das Probenintervall auf 20 Minuten, nach 3 Stunden auf 30 Minuten verlängert, da nach dieser Zeit die Änderungen der Phosphatkonzentration nur noch langsam stattfand.

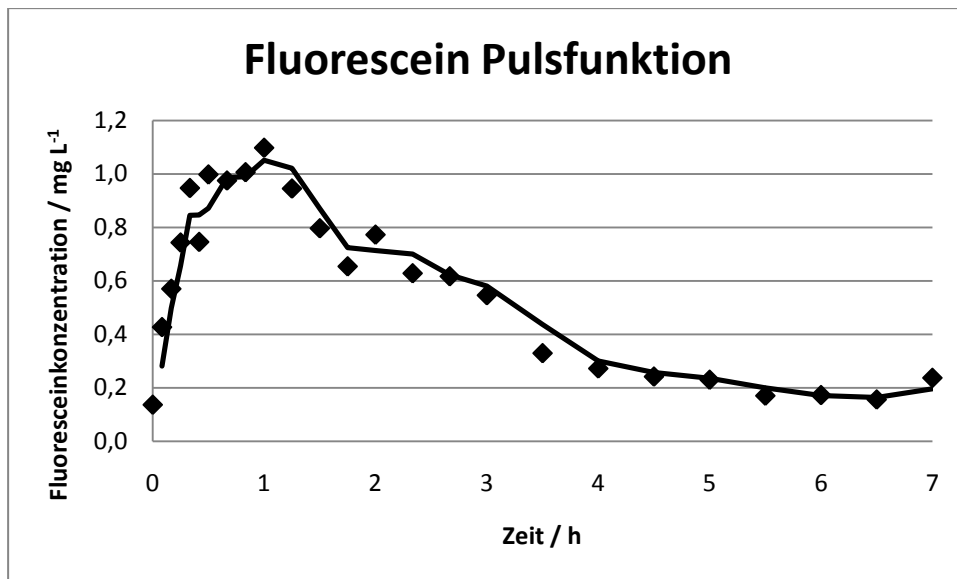
Ein Versuch wurde nach ca. 7.5 Stunden beendet, abhängig davon, wie lange die Einstellung des pH-Werts vor Versuchsbeginn gedauert hatte, da bei dieser Prozedur jeweils Reaktionslösung verloren ging. Aufgrund dieser Unregelmäßigkeit wurden die nachfolgenden Berechnungen nicht bis zum Versuchsende, sondern bis zum ohnehin anvisierten Zeitpunkt 7 Stunden nach Beginn durchgeführt, um alle Versuche möglichst exakt vergleichen zu können.

Die Filterpapiere im Büchnertrichter wurden abhängig von der Menge an abfiltriertem Feststoff ca. alle 30 Minuten gewechselt, über Nacht ohne Erwärmung getrocknet, am nächsten Tag ausgewogen und das Produkt röntgendiffraktometrisch vermessen.

#### **4.3.5 Theoretische Betrachtung des Reaktors**

Der zur Bestimmung von Phosphatbinderkapazitäten konzipierte und gebaute Reaktor (siehe Kapitel 4.3.3) beinhaltet Aspekte mehrerer Reaktortypen aus der chemischen Reaktionstechnik, nämlich CSTR, SBR und Kaskade. Dies macht theoretische Berechnungen wie z. B. des Umsatzes außerordentlich kompliziert. Dazu kommt, dass für die vorliegenden heterogenen Reaktionen (Kristallisation) keine Geschwindigkeitsgesetze erster Ordnung gelten und es sich außerdem um schnelle Reaktionen handelt, deren Geschwindigkeitskonstanten im vorliegenden Aufbau nicht bestimmbar sind.

Zur Ermittlung der Reaktorkinetik wurden Puls- sowie Sprungfunktionen mit dem inerten Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein bzw. dessen Dinatriumsalz Uranin gemessen. Die Messung erfolgte mittels UV-Vis-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 514 nm und wurde mit einem Varian Cary 1 Bio UV-Vis Photospectrometer mit der Software Varian Win-UV ausgeführt.

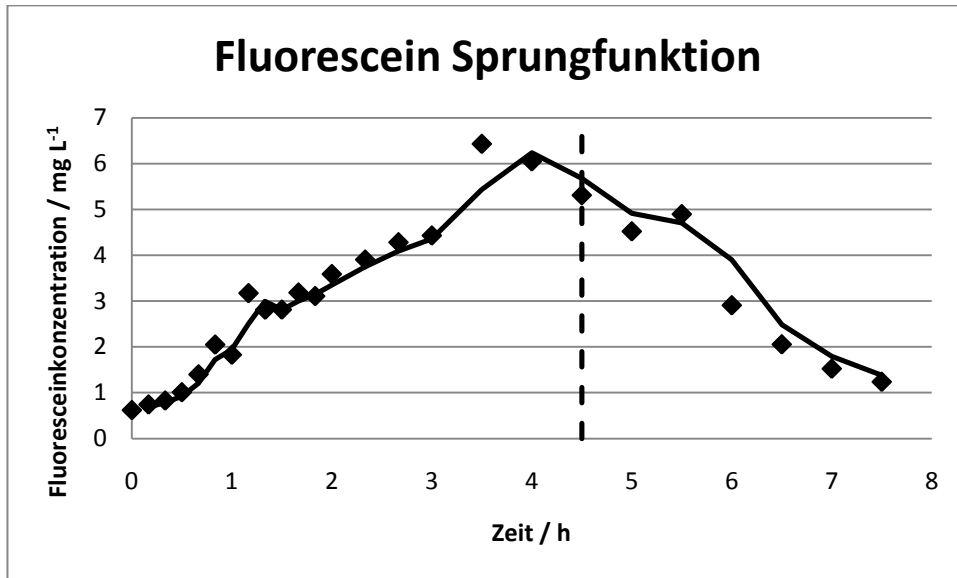


**Abb. 4.3.5.1:** Pulsfunktion von 20 mL einer 100 mg L<sup>-1</sup> Fluorescein-Lösung in den „Magen“ der laufenden Anlage, Probennahme am Auslauf des „Darms“

Die Zugabe eines „Pulses“ von 20 mL einer 100 mg L<sup>-1</sup> Fluorescein-Lösung in den „Magen“ der mit Reinstwasser gefüllten laufenden Anlage kommt der Zugabe einer oder mehrerer Tabletten recht nahe, allerdings haben diese ein etwas geringeres Volumen. Es wurden trotzdem 20 mL gewählt, um eine gut messbare Konzentration am Ausgang der Anlage zu erhalten, wo die Proben wie bei einem Phosphatbinderversuch jeweils genommen wurden. Eine Erhöhung der Lösungskonzentration war aufgrund begrenzter Löslichkeit des Farbstoffs nicht möglich.

Abb. 4.3.5.1 zeigt, dass bereits nach einer Stunde das Konzentrationsmaximum des Farbstoffs im „Darm“ erreicht wurde, was mit der vorgegebenen Verweilzeit von etwa einer Stunde im „Magen“ korrespondierte. Danach fiel die Konzentration wieder, bis sie nach 5-6 Stunden wieder den Ausgangswert erreichte. Dieser war trotz einer Hintergrundmessung im UV-Vis aufgrund der geringen Konzentration an Farbstoff nicht gleich null, da am Anfang und am Ende der Messung die Werte im Bereich der Nachweisgrenze des Geräts lagen und kleine Schwankungen der Absorptionsintensität große Wirkung zeigten.

Bei Phosphatmessungen traten diese Probleme nicht in diesem Maße auf, da dort die Absorption wesentlich stärker war und Schwankungen so kaum zum Tragen kamen.



**Abb. 4.3.5.2:** Sprungfunktion einer  $100 \text{ mg L}^{-1}$  Fluorescein-Lösung mit Zufluss in die Anlage von  $2 \text{ mL min}^{-1}$  bei gleichzeitigem Zufluss von  $34 \text{ mL min}^{-1}$  Reinstwasser (entspricht Reaktionsbedingungen); Probennahme am Ausfluss; Zufluss von Wasser statt Fluorescein-Lösung nach 4.5 h

Abb. 4.3.5.2 zeigt die aufgenommene Sprungfunktion, die durch Zufluss von  $2 \text{ mL min}^{-1}$  von  $100 \text{ mg L}^{-1}$  Fluoresceinlösung und  $34 \text{ mL min}^{-1}$  Reinstwasser in die bereits mit Reinstwasser gefüllte Anlage erhalten wurde. Abgesehen vom in der Anlage vorhandenen Wasser wird das Fluorescein also 1:18 verdünnt.

Man erkennt ein stetiges Anwachsen der Konzentration, bis nach ca. 3.5 h das Maximum erreicht wird. Dieses Maximum liegt mit  $6.43 \text{ mg L}^{-1}$  etwas über dem theoretischen Gleichgewichtswert von  $5.56 \text{ mg L}^{-1}$  ( $100 \text{ mg L}^{-1}/18$ ). Der starke Sprung zwischen den zwei Werten nach 3 bzw. 3.5 h deutet allerdings auch auf einen Messfehler hin, wenn man den ansonsten recht geraden Verlauf der Kurve bis dahin betrachtet. Nach 4.5 Stunden wurde anstatt weiteren Fluoresceins Reinstwasser mit  $2 \text{ mL min}^{-1}$  in die Anlage gepumpt und man beobachtet einen stetigen Abfall der Konzentration.

Die durchgeführten Messungen zeigen, dass die mittlere Verweilzeit eines als Puls zugegebenen Stoffes in den vorliegenden Aufbau in etwa dem entspricht, was bei der Konzipierung gewünscht war, nämlich etwa eine Stunde im „Magen“ und dann langsames Ausspülen bis zu 5 Stunden im „Darm“. Die Sprungfunktion zeigt, dass nach ca. 3-4 Stunden die Konzentration im „Darm“ den Konzentrationen im Zufluss entsprechen, also zu diesem Zeitpunkt die ursprünglich im „Magen“ vorhandene Lösung komplett durchgespült wurde.

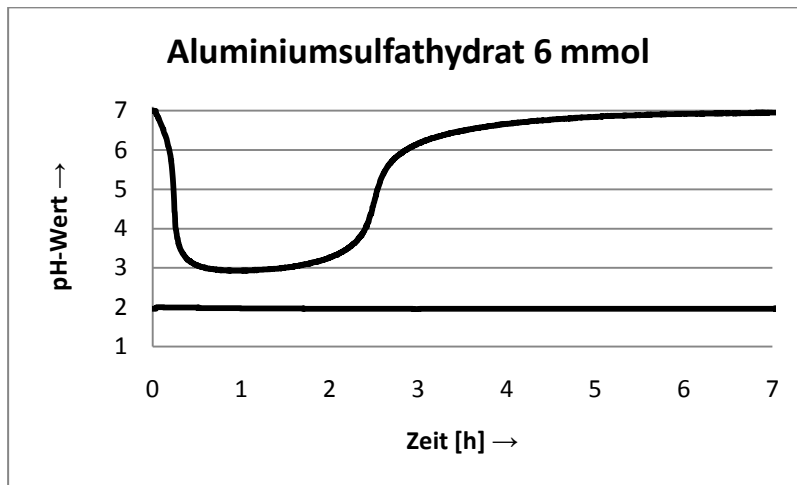
#### 4.3.6 Auswertung

Alle angefallenen Daten wurden in Microsoft Excel<sup>®</sup> 2007 importiert und ausgewertet. Zunächst wurde eine pH-Kurve angefertigt, wofür lediglich die in Sekunden aufgenommenen Zeitwerte in Stunden und die vierstellig aufgenommenen pH-Werte in Dezimalwerte umgerechnet werden mussten. Für einen korrekten Zeitwert musste noch die Vorlaufzeit abgezogen werden, in der zwar Werte gemessen wurden, aber der eigentliche Versuch noch nicht begonnen hatte. Die beispielhafte Tabelle 4.3.6.1 und das daraus resultierende Diagramm in Abb. 4.3.6.2 sind im Weiteren gezeigt:

Time	pH(1)	pH(2)	Temp(1)	Temp(2)	Zeit [h]	pH(1) echt	pH(2) echt
6497	1960	6990	36.8	37.2	0,02	1,96	6,99
6509	1960	6990	36.8	37.2	0,02	1,96	6,99
6521	1960	6990	36.8	37.2	0,03	1,96	6,99
6533	1960	6990	36.8	37.2	0,03	1,96	6,99
6545	1960	6990	36.8	37.2	0,03	1,96	6,99
6557	1990	6930	36.7	37.2	0,04	1,99	6,93
6569	1990	6900	36.8	37.2	0,04	1,99	6,9
6581	1990	6900	36.8	37.2	0,04	1,99	6,9
6593	1990	6900	36.8	37.2	0,05	1,99	6,9
6605	1990	6870	36.8	37.2	0,05	1,99	6,87
6617	2000	6860	36.8	37.2	0,05	2	6,86
6629	2000	6850	36.8	37.2	0,06	2	6,85
6641	2000	6810	36.8	37.2	0,06	2	6,81

**Tab. 4.3.6.1:** Beginn einer Messung: Die 5 linken Spalten enthalten die unbehandelten Messwerte, in der sechsten Spalte wird der korrekte Zeitwert

unter Umrechnung der Sekunden in Stunden und Abzug der Vorlaufzeit von 6420 s wiedergegeben. Mit den beiden rechten Spalten zusammen, die die pH-Werte als Dezimalzahlen enthalten, wurde das folgende Diagramm erstellt:



**Abb. 4.3.6.2:** Beispielhaftes pH-Diagramm; die untere Kurve zeigt den pH-Wert im „Magen“, die obere im „Darm“.

Das oben gezeigte Diagramm stammt von einem Testversuch mit Aluminiumsulfathydrat. Bei Zugabe des Materials ist der Abfall des pH-Werts im „Darm“ klar zu sehen, ebenso wie die Rückkehr in den neutralen Bereich bei Versuchsende.

Die pH-Kurven waren vor allem für die Bestätigung der immer vergleichbaren Versuchsdurchführung von Bedeutung, da zu große Unterschiede bei den pH-Werten nach mehreren Stunden gezeigt hätten, dass die Ausgangslösungen nicht korrekt aufeinander abgestimmt waren. Bei allen durchgeführten Versuchen lagen die größten Abweichungen von den eingestellten pH-Werten von 2 bzw. 7 unter 0.2, weshalb man festhalten kann, dass die Versuche bei annähernd gleichen Bedingungen durchgeführt wurden.

Desweiteren konnte anhand des pH-Verlaufs teilweise auf die Natur der gefällten Produkte geschlossen werden, siehe unten.

Die Ermittlung der gebundenen Phosphatmenge und damit Aussagen zur Phosphatbindekapazität einzelner Wirkstoffe, nicht direkt möglich.

Zunächst wurden einfache Diagramme aus den mittels UV-Vis ermittelten Phosphatkonzentrationen der genommenen Proben und den dabei notierten Zeitpunkten erstellt. Diese mussten aufgrund des zwölfsekündigen Messtakts mit 12 multipliziert und anschließend durch 3600 dividiert werden, um auf den Stundenwert zu kommen, außerdem musste erneut die Vorlaufszeit abgezogen werden. Die resultierenden Diagramme mussten nun integriert werden, um festzustellen, wieviel vom gesamten während des Versuchs durch die Anlage geströmten Phosphats von den getesteten Substanzen gebunden wurde.

Probe	Datenpunkt	Zeit [h]	Concentration (mg/L)	Konz. [mM]
1	535	0,00	545.252.943	5,74
2	592	0,19	4.157.029.629	4,38
3	641	0,35	3.406.816.006	3,59
4	691	0,52	3.144.910.097	3,31

**Tab. 4.3.6.3:** Versuchsbeginn mit schnell abfallender Phosphatkonzentration; „Concentration (mg/L)“ ist der vom UV-Vis gelieferte Wert der Phosphatkonzentration, „Konz. [mM]“ der daraus berechnete zur Auswertung nötige Wert in Millimol; falls die Messwerte auf die Ziffer 0 endeten, gab das UV-Vis wie hier bei Probe 1 einen um eine Ziffer verkürzten Wert an, der damit eine Zehnerpotenz zu klein war, was für die weitere Berechnung ausgeglichen werden musste.

Die Integration über der Kurve musste mit einem Mittelwert als Ausgangswert durchgeführt werden, da alle Ausgangswerte für sich allein fehlerbehaftet waren, und eine Abweichung um wenige Prozent große Unterschiede bei der Integration verursacht hätte.

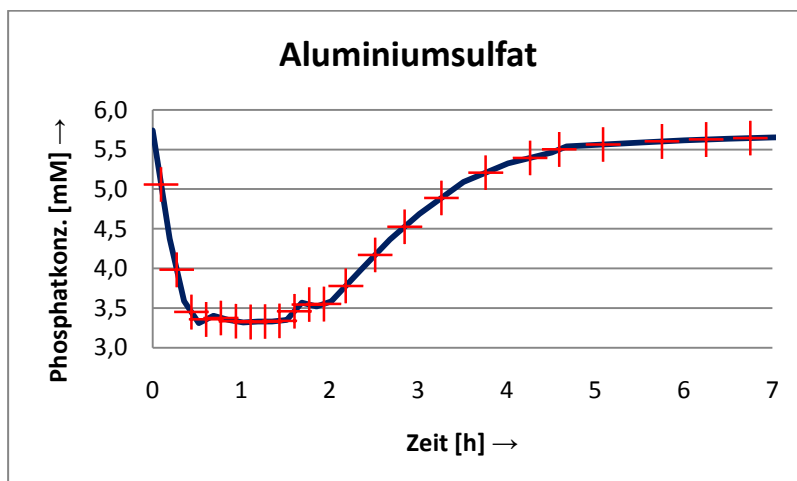
Für die Konzentration von 6 mM wurde ein Mittelwert von 5.79 mM bei einer Standardabweichung von 0.08 für 15 Messwerte ermittelt, für die Konzentration von 3 mM wurde ein Mittelwert von 2.89 bei einer Standardabweichung von 0.06 für 12 Messwerte ermittelt.



Die eingestellten Phosphatwerte der Ausgangslösungen werden jeweils unterschritten, da alle Proben am Auslauf der Anlage genommen werden mussten und sie dort bereits durch die Natriumhydroxidlösung verdünnt waren. Das Verhältnis der zugeführten Lösungen war 34:1, deshalb waren die theoretischen Werte 5.83 mM bzw. 2.91 mM, was den gemessenen Werten sehr nahe kommt. Diverse Testmessungen an den unverdünnten Ausgangslösungen wie auch an durchgeführten statischen Versuchen zeigten jedoch, dass die angenommenen theoretischen Phosphatkonzentrationen durchaus korrekt waren und die UV-Vis-Methode auch hinreichend genau war.

Die numerische Integration über die gemittelten Ausgangswerte erfolgte über die Trapezregel:

Der Durchschnittswert zweier aufeinander folgender Datenpunkte wurde berechnet und vom oben beschriebenen gemittelten Ausgangswert abgezogen. Dieser Y-Wert wurde mit der Zeitdifferenz der zwei zugehörigen Datenpunkte als X-Wert multipliziert. Somit wurde die Fläche dieses Quadrats und auch der darauf folgenden Quadrate bis zum anvisierten Ende bei 7 Stunden bestimmt. In Abb. 4.3.6.4 sind sowohl die Phosphatkonzentrationskurve als auch die eben beschriebenen Punkte zur Integration als Kreuze dargestellt.



**Abb. 4.3.6.4:** Phosphatkonzentrationskurve mit Punkten zur Integration

Die Punkte zur Flächenberechnung liegen in guter Übereinstimmung auf der Konzentrationskurve, abweichende Messwerte werden zum Teil ausgeglichen.

### 4.3.7 Ergebnisse

Die Tabellen 4.3.7.1 und 4.3.7.2 geben eine Übersicht über die verwendeten Phosphatbinder und Chemikalien, ihre Inhaltsstoffe, Dosis und erwartete Reaktionsprodukte:

Phosphatbinder	Antiphosphat <sup>®</sup>	Calciumacetat Nefro <sup>®</sup>	Calciumcarbonat Fresenius <sup>®</sup>	Fosrenol <sup>®</sup>	Renagel <sup>®</sup>
Art und Menge des Wirkstoffs	600 mg Al(OH) <sub>3</sub>	700 mg Ca(Ac) <sub>2</sub>	500 mg CaCO <sub>3</sub>	1240 mg La <sub>2</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	800 mg Sevelamer
Chemisch aktiver Bestandteil	Al <sup>3+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	La <sup>3+</sup>	R-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Gruppen
Menge pro Tablette	212 mg 7.86 mmol	177 mg 4.42 mmol	200 mg 4.99 mmol	750 mg 5.40 mmol	148.4 mg 4.19 mmol Cl <sup>-</sup> Ionen
Erwartetes Produkt nach Phosphatbindung	AlPO <sub>4</sub>	HAP / OCP	HAP / OCP	LaPO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>+</sup> an PAH gebunden
Menge Produkt nach Bindung (erwartet)	959 mg 7.86 mmol	HAP 444 mg 0.884 mmol OCP 542 mg 0.552 mmol	HAP 501 mg 0.998 mmol OCP 612 mg 0.623 mmol	1263 mg 5.40 mmol	1198 mg Polymerkettenlänge unbekannt
Gebundenes Phosphat pro Tablette (erwartet)	747 mg 7.86 mmol	HAP 252 mg 2.66 mmol OCP 314 mg 3.32 mmol	HAP 285 mg 3.00 mmol OCP 356 mg 3.75 mmol	513 mg 5.40 mmol	398 mg 4.19 mmol
Anzahl Tabletten pro Versuch	2	3	3	1 (gemörsert)	3
Phosphat pro Versuch gebunden (erwartet)	1494 mg 15.7 mmol	HAP 757 mg 7.98 mmol OCP 946 mg 9.96 mmol	HAP 854 mg 9.00 mmol OCP 1068 mg 11.25 mmol	513 mg 5.40 mmol	1193 mg 12.6 mmol

**Tabelle 4.3.7.1:** Übersicht über die verwendeten Phosphatbinder, ihren Inhalt und die erwarteten Produkte der Phosphatbindung

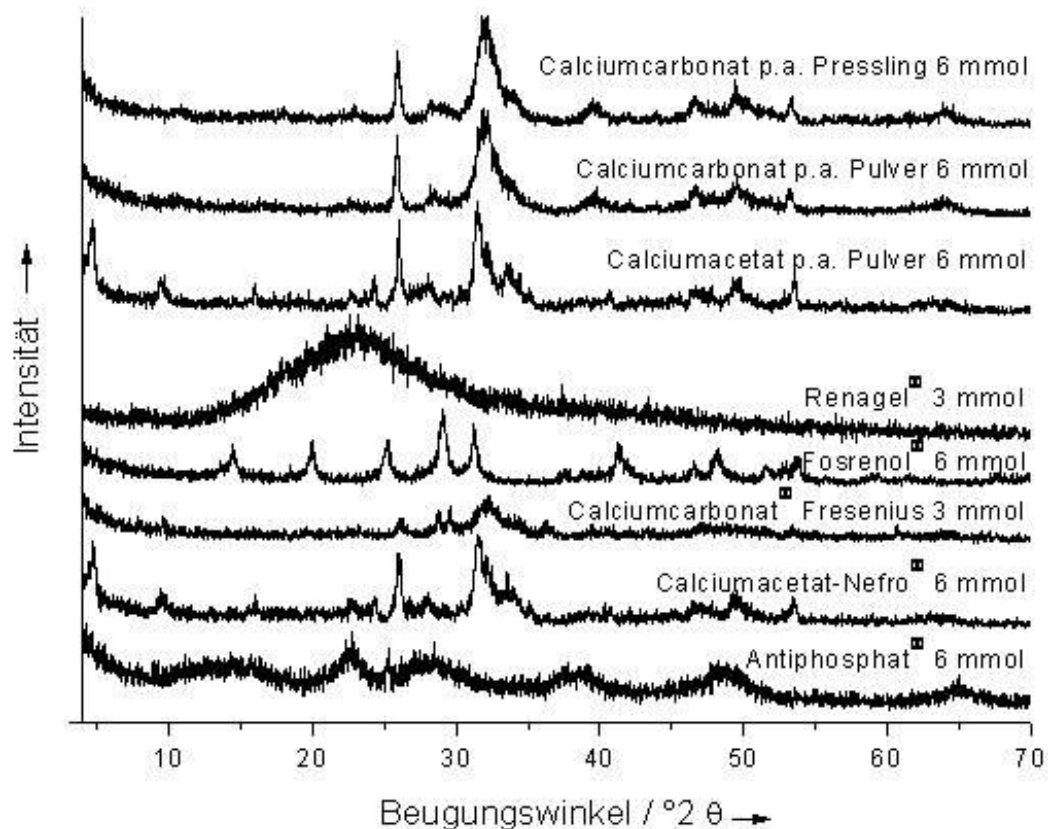
Phosphatbinder	Aluminiumsulfat p.a. Pulver	Calciumacetat p.a. Pulver	Calciumcarbo- nat p.a. Pulver	Calciumcarbo- nat p.a. Pressling
Art und Menge des Wirkstoffs	2695 mg $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 16 \text{H}_2\text{O}$	210 mg $\text{Ca}(\text{Ac})_2$	1500 mg $\text{CaCO}_3$ (Calcit)	1500 mg $\text{CaCO}_3$ (Calcit)
Chemisch aktiver Bestandteil	$\text{Al}^{3+}$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$
Menge pro Versuch	230 mg 8.52 mmol	532 mg 13.28 mmol	600 mg 14.99 mmol	600 mg 14.99 mmol
Erwartetes Produkt der Phosphatbindung	Aluminium- phosphat $\text{AlPO}_4$	HAP / OCP	HAP / OCP	HAP / OCP
Menge Produkt nach Bindung (erwartet)	1039 mg 8.52 mmol	HAP 1336 mg 2.66 mmol OCP 1631 mg 1.66 mmol	HAP 1502 mg 2.99 mmol OCP 1837 mg 1.87 mmol	HAP 1502 mg 2.99 mmol OCP 1837 mg 1.87 mmol
Menge gebundenes Phosphat (erwartet)	809 mg 8.52 mmol	HAP 757 mg 7.97 mmol OCP 946 mg 9.96 mmol	HAP 854 mg 8.99 mmol OCP 1068 mg 11.24 mmol	HAP 854 mg 8.99 mmol OCP 1068 mg 11.24 mmol

**Tabelle 4.3.7.2:** Übersicht über die zum Vergleich eingesetzten Chemikalien, deren Inhalt und die erwarteten Produkte der Phosphatbindung

Zur Erklärung muss gesagt werden, dass beim Wirkstoff Sevelamer<sup>®</sup> des Medikaments Renagel<sup>®</sup> die Phosphatbindekazität nur indirekt anhand des Chloranteils als Gegenion für die Aminogruppen bestimmt werden konnte. Es wurde davon ausgegangen, dass für jedes Chlorion während des Versuchs ein Phosphation bzw. aufgrund des neutralen pH-Werts im „Darm“ ein Dihydrogenphosphat-Ion gebunden wird. Nach Bestimmung der Masse an enthaltenem Chlor zu 148.4 mg pro Tablette konnte die theoretisch gebundene Phosphatmenge berechnet werden. Die erwartete Produktmenge konnte jedoch nur in mg und nicht in mmol berechnet werden, da es sich bei Sevelamer<sup>®</sup> um ein Polymer (PAH) handelt, dessen genaue Kettenlänge vom Hersteller nicht angegeben wurde. Die Produktmenge in mg wurde als Summe des erwarteten

gebundenen Phosphats (398 mg) und der vom Hersteller angegebenen Wirkstoffmenge pro Tablette (800 mg) berechnet.

Bei den calciumhaltigen Präparaten und Chemikalien werden die Grenzfälle der beiden mittels XRD nachgewiesenen Calciumphosphatphasen Hydroxylapatit  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  (HAP) und Octacalciumphosphat  $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  (OCP) diskutiert und auch in der Tabelle angegeben. Wird reiner HAP als entstehende Phase angenommen, so bindet jedes Calciumion 0.6 Phosphationen, bei reinem OCP hingegen sind es 0.75. Beide Grenzfälle treten unter den vorliegenden Versuchsbedingungen nicht ein, es entsteht abhängig vom pH-Wert immer ein Gemisch aus beiden Phasen, die röntgendiffraktometrisch nur schwer zu unterscheiden sind (siehe Abb. 4.3.7.3).



**Abb. 4.3.7.3:** Ausgewählte Röntgendiffraktogramme der abfiltrierten Fällungsprodukte der Phosphatbindung

Abbildung 4.3.7.3 zeigt die Röntgendiffraktogramme der abfiltrierten Reaktionsprodukte einiger ausgewählter Phosphatbindungsexperimente. Allgemein sind die in relativ kurzer Zeit und unter Rührung gefällten Produkte wenig kristallin, das auf einem Polymer beruhende Renagel<sup>®</sup> ist erwartungsgemäß vollkommen amorph.

Der Wirkstoff Lanthanarbonat beim Medikament Fosrenol<sup>®</sup> lässt  $\text{La}_2(\text{PO}_4)_3$  entstehen, der Wirkstoff Aluminiumhydroxidgel beim Medikament Antiphosphat<sup>®</sup>  $\text{AlPO}_4$ . Dieses ist allerdings kaum kristallin und auch die Ausgangssubstanz  $\text{AlO}(\text{OH})$  lässt sich noch im Diffraktogramm erkennen.

Die Röntgendiffraktogramme der Hauptreaktionsprodukte von Calciumacetat und Calciumcarbonat, OCP und HAP, weichen nur geringfügig voneinander ab, ein Reflex des OCP bei ca.  $5^\circ 2\theta$  dient als wichtigstes Unterscheidungsmerkmal. Die Fällungsprodukte der eingesetzten pulverförmigen Reinstoffe weisen eine etwas höhere Kristallinität auf, was auf deren etwas schnellere Löslichkeit und damit längere Kristallisationszeit zurückzuführen ist. Selbst die hergestellten Presslinge lösten sich schneller auf als die untersuchten Tabletten, da diese noch diverse Tablettierhilfsstoffe enthielten, beispielsweise um zu verhindern, dass sich das Material bereits im Mund löst, was zu unerwünschten Reaktionen bzw. schlechtem Geschmack führen könnte.

Die schnellere Löslichkeit sowohl der pulverförmigen als auch gepressten Reinstoffe lässt sich an den gemessenen pH-Kurven (Abb. 4.3.7.4 und 4.3.7.5) deutlich erkennen, bei der Phosphatbindung unterscheiden sich die Ergebnisse jedoch nur unwesentlich (Tab. 4.3.7.8).

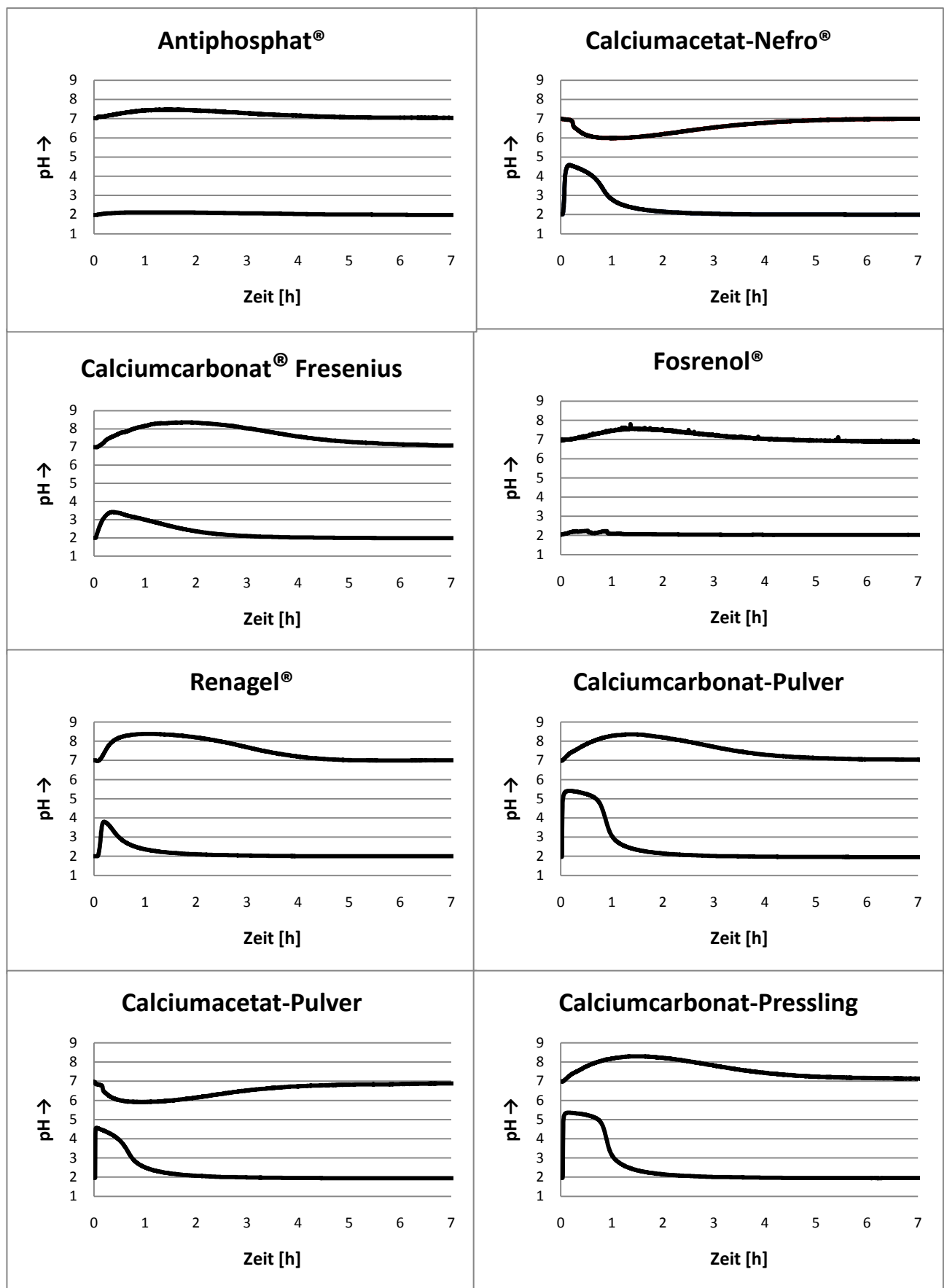
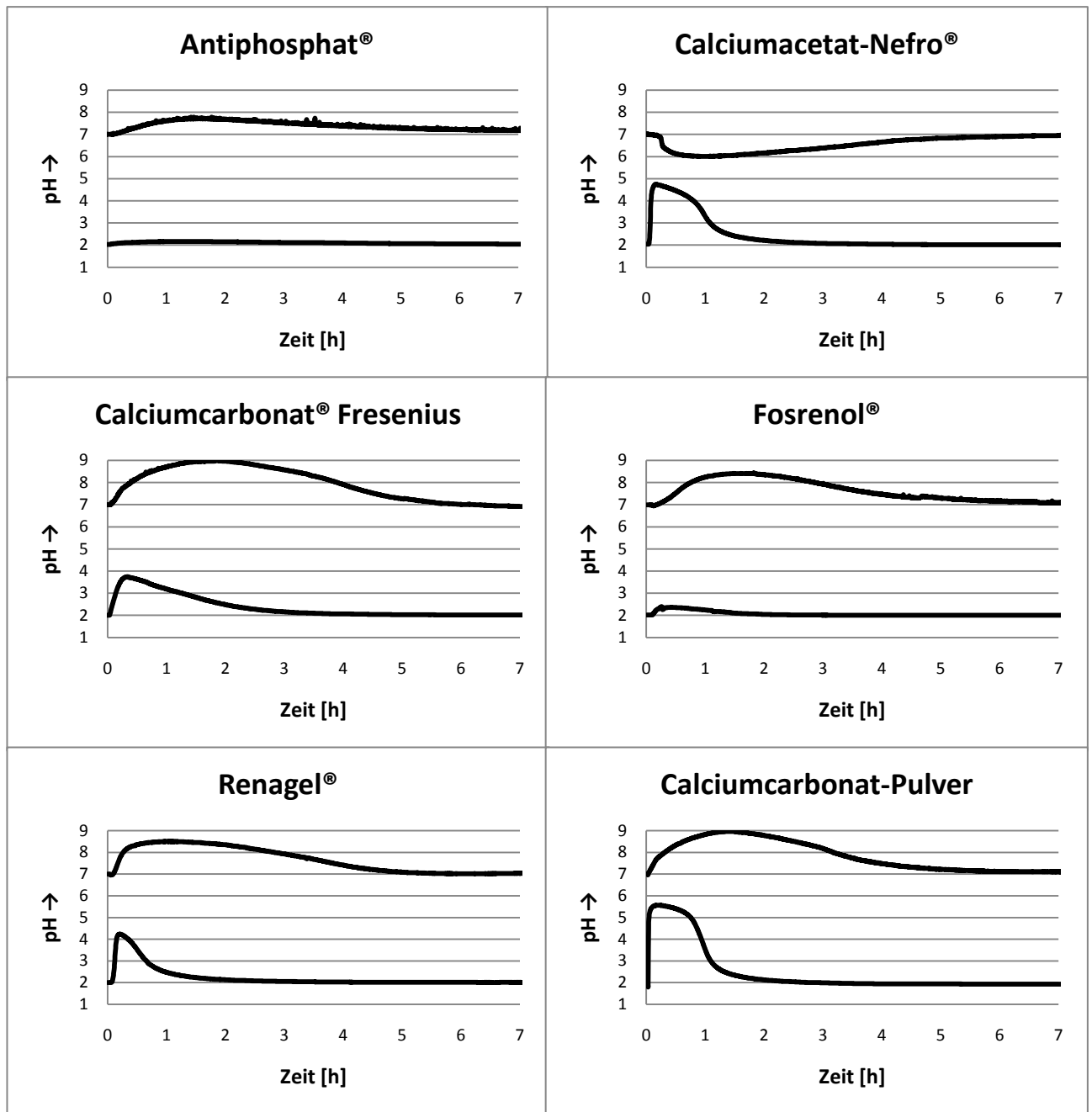


Abb. 4.3.7.4: pH-Kurven der Versuche bei der Phosphatkonzentration 6 mM



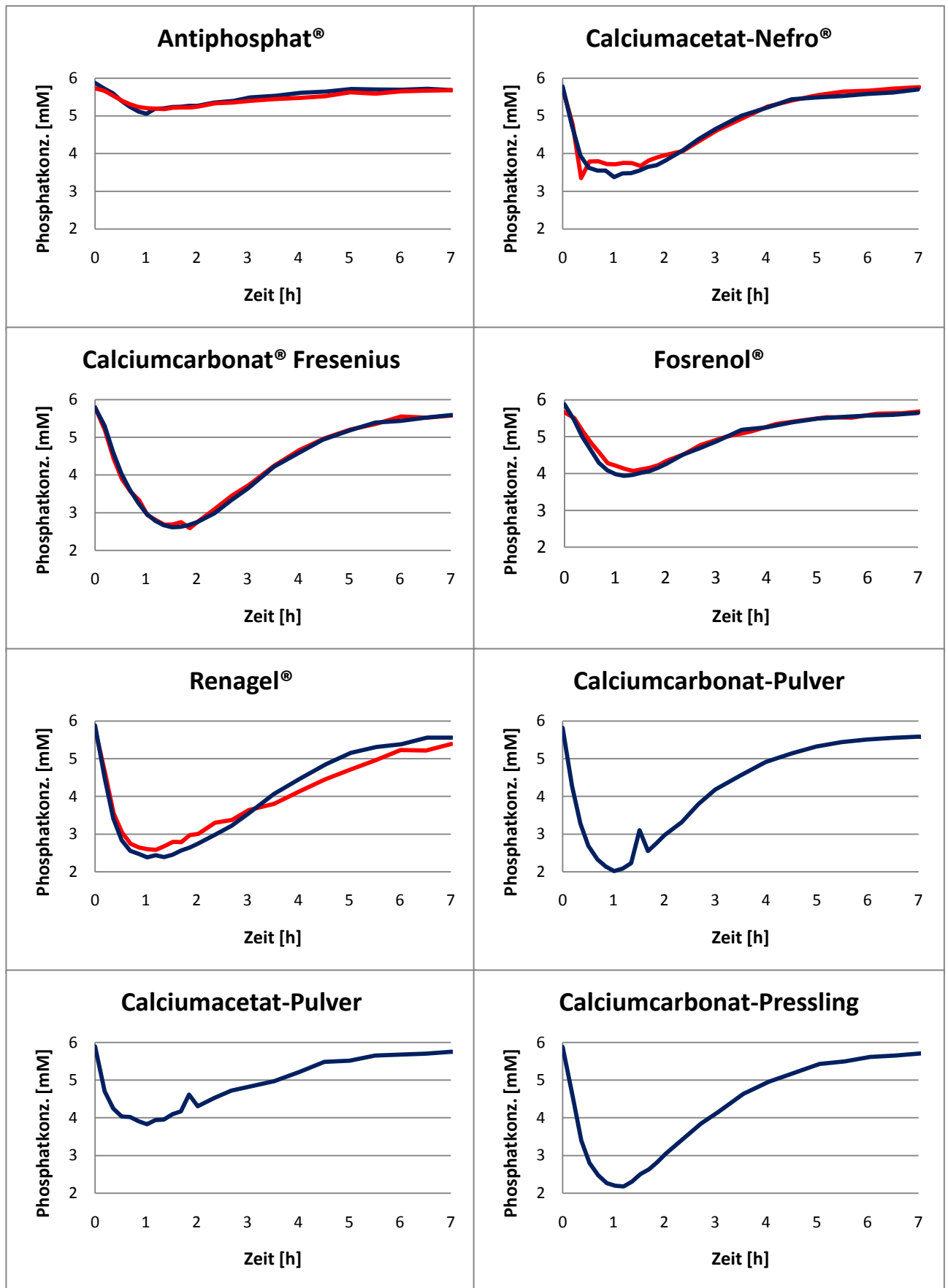
**Abb. 4.3.7.5:** pH-Kurven der Versuche bei der Phosphatkonzentration 3 mM

Die aufgenommenen pH-Verläufe nach Zugabe der Medikamente bzw. Chemikalien zeigten deutlich den Anstieg des pH-Wertes sowohl im „Magen“ als auch im „Darm“, lediglich Calciumacetat zeigte ein anderes Verhalten. Während alle anderen Wirkstoffe sauer reagierten, setzte beim Calciumacetat eine Pufferwirkung ein, wodurch der pH-Wert im „Darm“ nicht stieg, sondern auf bis zu 6 fiel. Die Konsequenzen daraus werden weiter unten diskutiert.

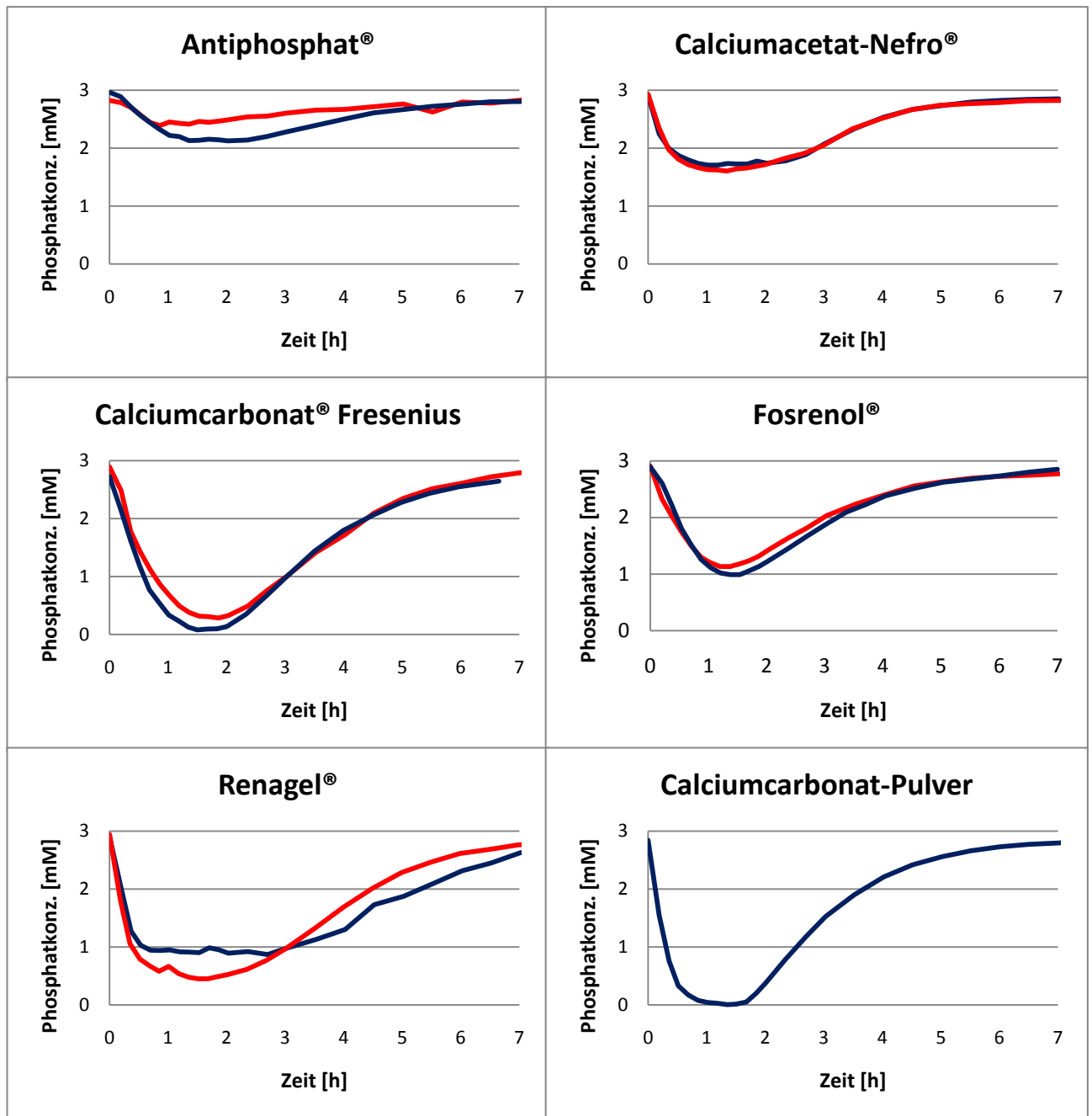
Vergleicht man die pH-Kurven beider Phosphatkonzentrationen (6 und 3 mM) fällt auf, dass die Auslenkungen vom Grundzustand bei der geringeren Konzentration höher ausfallen. Calciumcarbonat<sup>®</sup> Fresenius beispielsweise erreicht bei einer Konzentration von 6 mM im „Darm“ einen pH-Wert von 8.4, bei 3 mM von fast 9. Dies lässt sich auf die bereits zuvor erwähnte Pufferwirkung des Phosphatsystems zurückführen, die bei höherer Konzentration stärker ausgeprägt ist.

Die in allen Fällen beobachtete Rückkehr der pH-Werte auf ihre jeweiligen Ausgangswerte von 2 im „Magen“ und 7 im „Darm“ nach mehreren Stunden beweist die korrekte Einstellung der Phosphat- und Natriumhydroxidlösung aufeinander.





**Abb. 4.3.7.6:** Phosphatkonzentrationsverläufe bei einer Ausgangskonzentration von 6 mM; Medikamente wurden jeweils zweimal untersucht (rot/blau)



**Abb. 4.3.7.7:** Phosphatkonzentrationsverläufe bei einer Ausgangskonzentration von 3 mM

Die in Abb. 4.3.7.6 und 4.3.7.7 dargestellten Phosphatkonzentrationsverläufe dienten der in Kapitel 4.3.6 beschriebenen Auswertung zur Bestimmung der gebundenen Phosphatmenge.

Die fünf untersuchten Medikamente wurden bei beiden Phosphatkonzentrationen jeweils zweimal in unterschiedlichen Versuchen

vermessen, die zur Bestätigung betrachteten Chemikalien jeweils nur einmal, da sie nur geringfügig von den entsprechenden Medikamenten abwichen und dies durch ihre bessere Löslichkeit erklärbar war. Die dadurch etwas vorgezogenen Maxima der Phosphatbindung änderten jedoch nur wenig an der Gesamtmenge des gebundenen Phosphats. Beim Calciumcarbonat kann man von einer annähernden Entsprechung der Werte des Medikament und des eingesetzten Reinstoffs sprechen (Tabelle 4.3.7.8).

In den Diagrammen der fünf Medikamente sind jeweils beide Versuche in verschieden farbigen Kurven dargestellt, die geringen Abweichungen und damit die gute Reproduzierbarkeit der Untersuchungen sind klar erkennbar. Generell sind die Abweichungen bei Versuchen der kleineren Konzentration etwas größer, da bei ihnen die im Versuch eingesetzte Phosphatmenge kleiner war und somit Unterschiede stärker ins Gewicht fallen.

So überrascht es nicht, dass die über alle vergleichenden Versuche ermittelte größte Abweichung bei der kleinen Konzentration von 3 mM beim Medikament Antiphosphat<sup>®</sup> auftrat, das aufgrund seiner schwachen festgestellten Phosphatbindekazität ohnehin Erklärungsprobleme verursachte.

Tabelle 4.3.7.8 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse aller Phosphatbestimmungen aus obigen Kurven:

	Phosphatkonzentration 6 mmol L <sup>-1</sup>		Phosphatkonzentration 3 mmol L <sup>-1</sup>		
	geb. PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> [mg]	[%] von theor. Wert	geb. PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> [mg]	[%] von theor. Wert	
<b>Phosphatbinder</b>					Produkt (nach XRD)
<b>Antiphosphat<sup>®</sup></b>	222 ±19	15 ±1	239 ±54	16 ±4	AlPO <sub>4</sub> (kaum kristallin)
<b>Calciumacetat Nefro<sup>®</sup></b>	732 ±21	79-99 ±5	427 ±8	46-58 ±2	OCP
<b>Calciumcarbonat<sup>®</sup> Fresenius</b>	1089 ±9	102-128 ±1	969 ±35	91-113 ±4	HAP
<b>Fosrenol</b>	564 ±18	110 ±3	568 ±17	111 ±3	LaPO <sub>4</sub>
<b>Renagel</b>	1286 ±34	108 ±3	1001 ±24	84 ±2	Amorph
<b>Aluminiumsulfat p.a. Pulver</b>	762	94	-	-	Amorph
<b>Calciumacetat p.a. Pulver</b>	594	63-79	-	-	OCP
<b>Calciumcarbonat p.a. Pulver</b>	1117	105-131	913	86-107	HAP
<b>Calciumcarbonat p.a. Pressl.</b>	1074	101-126	-	-	HAP

**Tabelle 4.3.7.8:** Zusammengefasste Ergebnisse der Messungen zur Bestimmung der Phosphatbinderkapazitäten mit Identifikation des gefällten Produkts

Sowohl die absolute Menge an gebundenem Phosphat als auch der prozentuale Anteil des erwarteten Werts sind in Tabelle 4.3.7.8 dargestellt. Dieser Prozentwert ergibt sich aus der bereits in Tabelle 4.3.7.1 vorgestellten erwarteten Menge an gebundenem Phosphat. Diese berechnet sich aus der Menge an Wirkstoff und dem daraus entstehenden erwarteten Produkt, weshalb bei den calciumhaltigen Substanzen auch erneut zwei Werte für die beiden Extremfälle reines OCP und reiner HAP angegeben werden.

Das ebenfalls zum Vergleich verwendete Aluminiumsalz Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·16 H<sub>2</sub>O wird hier der Vollständigkeit halber mit angegeben, die Erklärung seiner Verwendung und Ergebnisse folgt in der anschließenden Diskussion.

### 4.3.8 Diskussion und Vergleich mit Reinstoffen

Die in Tabelle 4.3.7.8 gezeigten Ergebnisse der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuche repräsentieren den ersten Vergleich aller zurzeit am häufigsten verwendeten Phosphatbinderklassen miteinander in einer für alle identischen Versuchsanordnung und unter gleichen Versuchsbedingungen.

Dazu kommen noch Vergleiche mit den Reinsubstanzen einiger in den Medikamenten enthaltenen Wirkstoffe sowie einem gut löslichen Aluminiumsalz, das zur Aufklärung der geringen experimentell festgestellten Phosphatbindekapazität des aluminiumhaltigen Medikaments Antiphosphat<sup>®</sup> dienen sollte.

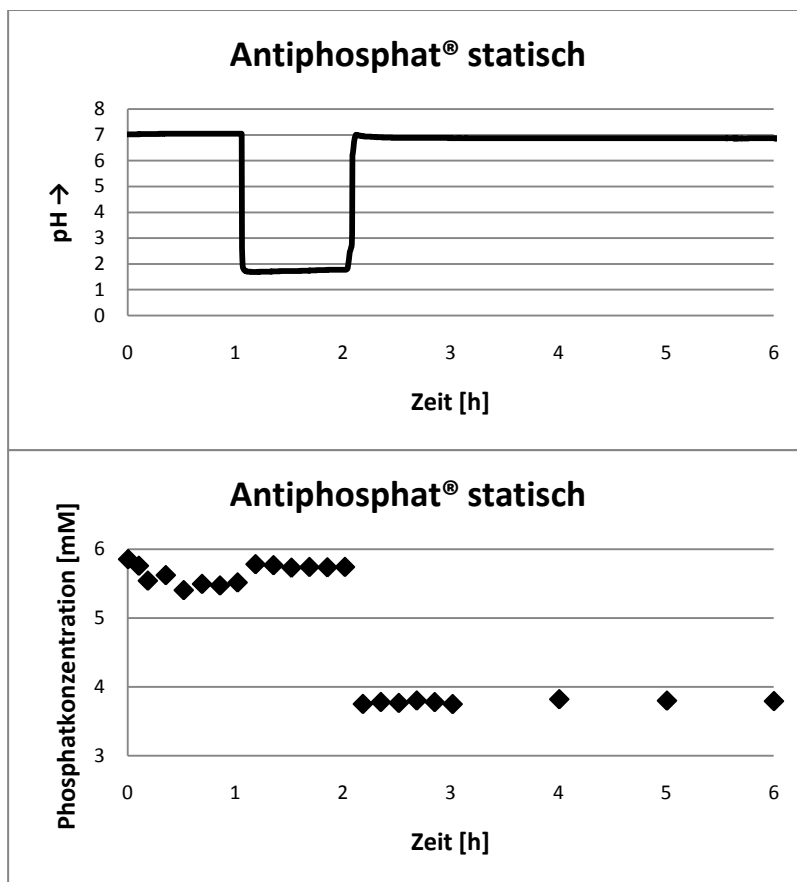
#### Antiphosphat<sup>®</sup>:

Obwohl dieses Präparat zur am längsten eingesetzten<sup>[94]</sup> Gruppe der aluminiumhaltigen Phosphatbinder gehört und diese im Einsatz beim Menschen gute Ergebnisse<sup>[89]</sup> liefern, zeigte Antiphosphat<sup>®</sup> in den hier vorgestellten Experimenten die schlechteste Phosphatbindekapazität.

Es band nur 15-16% der erwarteten Menge Phosphat beim angenommenen Produkt Aluminiumphosphat. Andere Produkte sind unter diesen Bedingungen unwahrscheinlich und  $\text{AlPO}_4$  konnte, wenn auch nur schwach kristallin, im Niederschlag festgestellt werden. Die Diffraktogramme zeigten jedoch auch verschiedene Aluminiumhydroxidphasen, was für eine nicht vollständige Umsetzung des Edukts sprach, denn Aluminiumhydroxidgel ist der vom Hersteller angegebene phosphatbindende Wirkstoff. Den in einer gemörserten Tablette identifizierten  $\text{AlO}(\text{OH})$ -Phasen Diaspor und Böhmit (JCPDS 01-084-0185; 01-076-1871) wurde bereits früher<sup>[95]</sup> schlechte Löslichkeit unter neutralen Bedingungen nachgewiesen, weshalb ein statischer Versuch durchgeführt wurde.

Es handelte sich dabei um einen auf 37 °C thermostatisierten Behälter, der 2 L einer 6 mM Phosphatlösung enthielt, die auf pH=7 eingestellt war. Zwei

Tabletten wurden hinzugegeben und lösten sich durch die Rührung auch physikalisch in kleine Stückchen auf, es kam jedoch nicht zu einer Lösung im chemischen Sinn, also zur Auflösung des Feststoffs in seine Ionen. Nach einer Stunde wurde der pH-Wert mit konzentrierter Salzsäure auf 2 gesenkt, ohne dass sich die trübe Lösung optisch änderte, die Stückchen wurden jedoch kleiner. Nach einer weiteren Stunde wurde der pH-Wert mit 5 M NaOH wieder auf 7 erhöht und der Versuch nach 6 Stunden beendet.



**Abb. 4.3.8.1:** pH- und Phosphatkonzentrationskurve des statischen Versuchs

Die während des gesamten Versuchs überwachte Phosphatkonzentration ist zusammen mit der pH-Kurve in Abb. 4.3.8.1 dargestellt. Zu Beginn bei neutralem pH und auch bei erniedrigtem pH wird sehr wenig Phosphat gebunden. Die erneute pH-Erhöhung führt zu einem sofortigen Abfall der Phosphatkonzentration ohne weitere Änderung bis zum Ende. Dieser Versuch zeigte, dass Antiphosphat® ohne Säureeinwirkung nicht oder nur sehr langsam

wirksam ist, denn erst nach deutlicher pH-Senkung entfaltete das Medikament seine Reaktivität. Aluminiumhydroxid wurde im Behälter wie auch im menschlichen Magen zumindest teilweise aufgelöst, sodass die nun freien  $\text{Al}^{3+}$  Ionen in der Lage waren, Phosphat zu binden.

Allerdings wurden nur 26% der zu erwartenden Menge Phosphat gebunden, obwohl die 425 mg (15.75 mmol) Aluminium enthaltenden Tabletten bei angenommenem vollem Umsatz zu Aluminiumphosphat alles Phosphat in Lösung hätten binden müssen. Es wurden mit 391 mg (4.12 mmol) nur 35% der in der Lösung vorhandenen 1.11 g (11.72 mmol) Phosphat entfernt.

Alle festen Bestandteile der Lösung wurden nach Versuchsende ab filtriert, getrocknet, gewogen und röntgendiffraktometrisch untersucht. Das Produkt enthielt schwach kristallines Aluminiumhydroxid und -phosphat. Die Masse betrug 1.19 g. Davon entfielen 503 mg (4.12 mmol) auf  $\text{AlPO}_4$ , die restlichen 11.63 mmol Aluminium hatten sich nicht gelöst und waren in der Form von  $\text{AlO}(\text{OH})$  erhalten geblieben, von dem 11.63 mmol 698 mg wiegen:

$$503 \text{ mg} + 698 \text{ mg} = 1201 \text{ mg}$$

Dies entspricht fast exakt der Masse des ausgewogenen Feststoffs von 1190 mg, womit sich sagen lässt, dass die Reaktion von Antiphosphat® in der vorliegenden Anlage erklärt ist. Die schlechte Phosphatbindekapazität beruht auf unvollständiger Auflösung des Wirkstoffs.

Zur Bestätigung dieser Theorie wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem das gut wasserlösliche Aluminiumsalz  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  eingesetzt wurde. Die Kurven der Phosphatkonzentration (Abb. 4.3.6.3) und des pH-Werts (4.3.6.2) sind im Kapitel Auswertung abgebildet. Wie schon in Tabelle 4.3.7.8 angegeben band Aluminiumsulfat 94% des bei der Bildung von  $\text{AlPO}_4$  zu erwartenden Phosphats, womit gezeigt werden konnte, dass ein aluminiumhaltiger Wirkstoff in der eingesetzten Anlage nur dann wirkt, wenn er vollständig dissoziiert ist. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Larson et al.<sup>[95]</sup>, die für die reinen

AlO(OH)-Phasen Diaspor und Böhmit sehr schlechte Löslichkeiten unter Bedingungen angeben, die den Versuchsbedingungen ähneln.

In diesem Zusammenhang eine weitere Möglichkeit für Aluminiumhydroxid diskutiert den Phosphatspiegel auch im menschlichen Körper zu senken. AlO(OH) kann durch Adsorption<sup>[95,96]</sup> im Magen- / Darmtrakt Phosphat entfernen, es ist jedoch nicht klar, wo dies geschieht und wie lange es dauert. In Laboruntersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Partikelgröße und damit verbunden die spezifische Oberfläche entscheidenden Einfluss auf die Phosphatbindekapazität hat<sup>[96,97]</sup>. Ein Adsorptionsmechanismus kann allerdings in keinem Fall an die Phosphatbindekapazität durch eine chemische Reaktion heranreichen, da immer nur die Oberfläche der adsorbierenden Teilchen reagieren kann und nicht jedes mögliche Atom bzw. Molekül.

Es muss allerdings auch angemerkt werden, dass es nicht unbedingt wünschenswert ist, gelöstes Aluminium im Verdauungstrakt zu haben, denn es kann die Darmwand und sogar die Blut-Hirn-Schranke<sup>[98]</sup> passieren, was zu diversen Erkrankungen führen kann<sup>[25,98,99]</sup>.

Aus diesen Gründen hat man in den letzten Jahren auch immer mehr Abstand von aluminiumhaltigen Phosphatbindern genommen, trotz ihrer guten Wirksamkeit *in-vivo*<sup>[89]</sup>. Sie werden vor allem bei sehr alten Patienten eingesetzt, deren Sorgen vor Langzeitschäden<sup>[100]</sup>, auch aufgrund des langsameren Stoffwechsels, gering sind.

#### Calciumacetat-Nefro®:

Dieses Präparat war das einzige, das den pH-Wert des „Darms“ der verwendeten Anlage senkte, statt ihn wie alle anderen Medikamente anzuheben. Der Grund dafür liegt im amphoteren Charakter des Acetatmoleküls, das in Richtung seines pKs-Werts 4.76 puffert und somit einen niedrigeren pH-Wert wie 2 im „Magen“ auch deutlich anhebt.



Die durch die Phosphataufnahme des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions entstehenden Calciumphosphate fallen bevorzugt im neutralen oder basischen Bereich<sup>[20]</sup> aus, was bei den Versuchen klar erkennbar war, auch wenn im „Darm“ mit pH=6-7 leicht saure Verhältnisse herrschten. Dadurch wurde nach Röntgenbeugung Octacalciumphosphat (OCP)  $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  ermittelt statt dem bei basischem pH-Wert bevorzugten Hydroxylapatit (HAP)  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ .

Calciumacetat-Nefro® erreichte bei einer Phosphatkonzentration von 6 mM 79 % der theoretischen maximalen Phosphatbindekapazität bei angenommenem reinem OCP und 99 % bei angenommenem reinem HAP. Der OCP-Wert dürfte der realistischere sein, allerdings muss man berücksichtigen, dass Calciumphosphate oft calciumdefizitär auskristallisieren, besonders wenn man von eher amorphen Vorstufen ausgehen kann<sup>[101]</sup>. Durch eine defizitäre Summenformel wie zum Beispiel  $\text{Ca}_{5-x}(\text{HPO}_4)_{2x}(\text{PO}_4)_{3-2x}\text{OH}$  würde der Prozentsatz weiter sinken. Versuche mit Calciumacetat p. a. Pulver führten zu vergleichbaren Ergebnissen, auch wenn die Phosphatbindekapazität mit 63-79 % geringer war als die des Medikaments. Dies erklärt sich durch die auch an den pH-Kurven sichtbare schnellere Löslichkeit des reinen Pulvers im Vergleich zu den Tabletten mit diversen anderen Bestandteilen und einem feinen Überzug (Macrogol, Glycerolmonooleat), der die Lösung bereits im Mund verhindern soll. Das Resultat ist ein tieferer pH-Wert im „Darm“ beim Pulver, was für die Calciumphosphatkristallisation nicht förderlich ist.

Bei einer Phosphatkonzentration von 3 mM erreichte das Medikament 46 % (OCP) bzw. 58 % (HAP) des theoretischen Werts. Der Grund für die Senkung der Phosphatbindekapazität war hier die geringere Übersättigung an Calciumphosphat, wodurch das Calcium nicht mehr seine volle Wirksamkeit entfalten konnte.

Calciumcarbonat® Fresenius:

Dieses Präparat löste sich im sauren Milieu des „Magens“ unter Kohlendioxidentwicklung auf und führte sowohl dort als auch im darauf folgenden „Darm“ zu einer deutlichen Erhöhung des jeweiligen pH-Werts.

Durch diesen im Vergleich zum Calciumacetat basischen Wert bei ca. 8 entstand als Hauptprodukt HAP statt OCP, was mittels CRD nachgewiesen wurde.

Bei der Phosphatkonzentration von 6 mM entfernte Calciumcarbonat® Fresenius 102 bzw. 128 % der erwarteten Phosphatmenge aus der Lösung nahm man als Produkt reines OCP bzw. reinen HAP an. Es werden Werte von über 100 % erreicht, weil mehr Phosphat entfernt wird als möglich, wenn man annimmt, dass 1  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion 0.75 (OCP) bzw. 0.6 (HAP) Phosphationen bindet. Offenbar wurde mehr Phosphat pro  $\text{Ca}^{2+}$  gefällt, was erneut für ein nichtstöchiometrisches, calciumdefizitäres Calciumphosphat spricht.

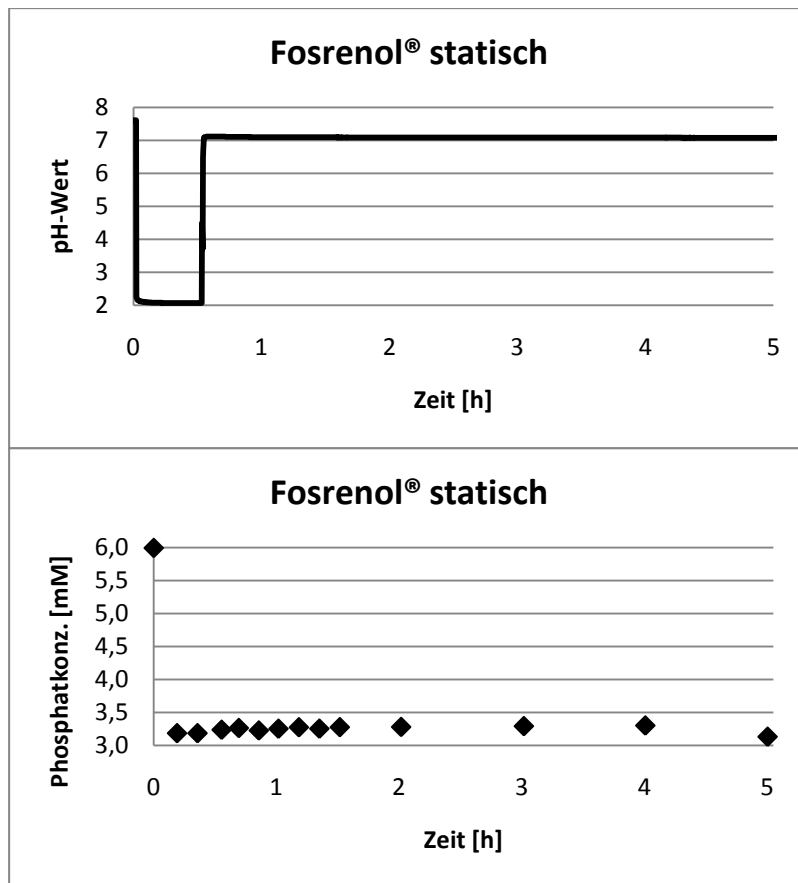
Bei der geringeren Phosphatkonzentration von 3 mM wurden 91 % (OCP) bzw. 113 % (HAP) des erwarteten Phosphats gebunden. Auch hier bestätigte sich der Trend, dass bei geringerer Übersättigung die Phosphatbindekapazität sinkt.

Die Vergleichsversuche mit Calciumcarbonatpulver und -presslingen führte zu praktisch identischen Werten bei der Phosphatbindung, obwohl beides sich deutlich schneller auflöste als die Tabletten von Fresenius.

Fosrenol®:

Da es sich bei den sehr großen lanthancarbonathaltigen Präparaten um Kautabletten handelte, wurden sie vor der Verwendung grob gemörsert.

Aufgrund des niedrigen Löslichkeitsprodukts<sup>[102]</sup> des Fällungsprodukts Lanthanphosphat entsteht dieses bereits unmittelbar nach Zugabe der Tablette in den „Magen“ eben dort. Dies führte bei Vorversuchen zu Verstopfungen des Überlaufs vom „Magen“ in den „Darm“, was durch genaue Ausrichtung jedoch vermieden werden konnte.



**Abb. 4.3.8.2:** Statischer Versuch mit Fosrenol®

Durch einen statischen Versuch, ähnlich wie oben beim Antiphosphat® beschrieben, konnte nachgewiesen werden, dass Fosrenol bereits bei niedrigem pH-Wert seine volle Phosphatbindekapazität ausschöpft. In Abb. 4.3.8.2 ist der Versuch dargestellt, bei dem eine Fosrenol® Tablette in eine auf pH=2 eingestellte Phosphatlösung gegeben wurde. Die Bindung setzte bereits nach wenigen Minuten ein und entfaltete ihre volle Wirkung. Die weiteren Konzentrationsmessungen ergaben auch nach Erhöhung auf pH=7 nach 30 Minuten keine wesentlichen Änderungen mehr. Es wurden exakt 100% des für  $\text{LaPO}_4$  angenommenen Phosphats gebunden.

Bei den Versuchen im fließenden Betrieb band Fosrenol® bei beiden eingesetzten Phosphatkonzentrationen jeweils 110% der für das Produkt  $\text{LaPO}_4$  errechneten Phosphatmenge. Es muss also auch hier ähnlich wie beim Calciumcarbonat von einer nicht exakt stöchiometrischen Zusammensetzung oder phosphatreicheren Nebenphasen ausgegangen werden. Im aufgenommenen

Röntgendiffraktogramm konnte jedoch nur wenig kristallines Lanthanphosphat identifiziert werden.

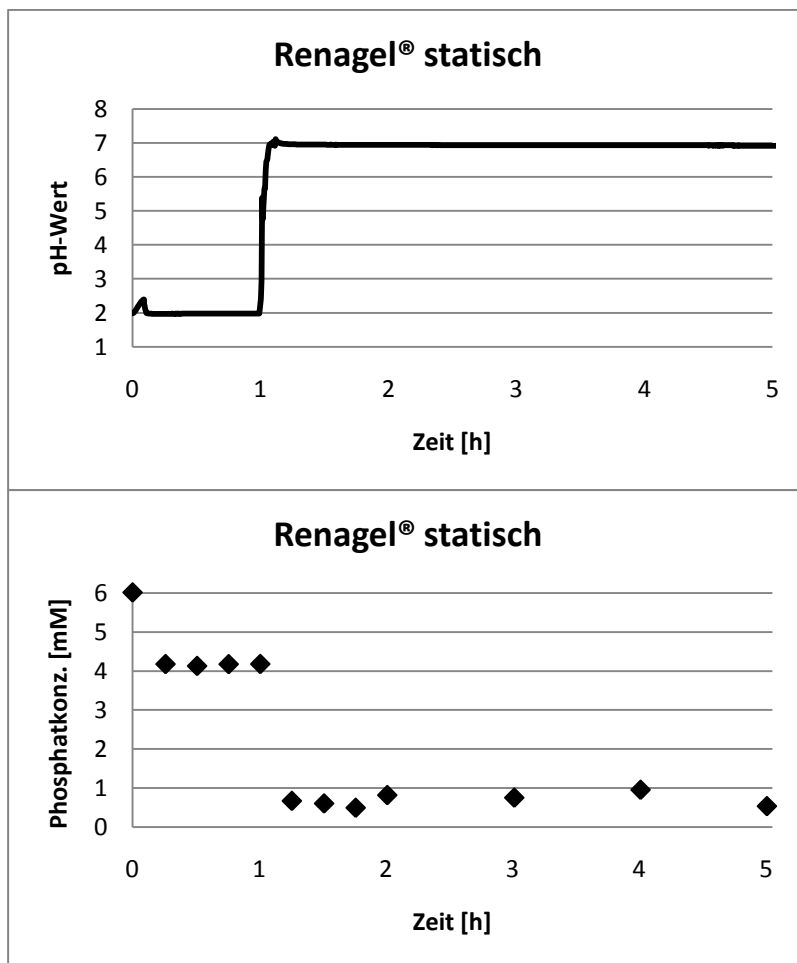
Die hohe Phosphatbindekapazität des Fosrenols® über einen weiten pH-Bereich wurde schon zuvor in mehreren Einzelstudien<sup>[92,103-105]</sup> beschrieben, doch leider muss dazu gesagt werden, dass solche Studien zu neuen Medikamenten oftmals von den jeweiligen Herstellern finanziert werden und deshalb an der Glaubwürdigkeit Zweifel bestehen.

Wichtig bei der Verwendung eines lanthanhaltigen Medikaments sind die Ergebnisse von Pennick et al.<sup>[106]</sup>, aus denen hervorgeht, dass Lanthan in nur sehr geringem Maße durch den Darm aufgenommen wird und selbst eine intravenöse Verabreichung nur zu extrem geringer Bioverfügbarkeit führt. Lanthan kann somit als ungefährlich angesehen werden, obwohl Versuche mit hohen Dosen *in vitro*<sup>[107]</sup> und bei Ratten<sup>[108]</sup> ergaben, dass Lanthan auch von Zähnen und Knochen aufgenommen werden kann.

#### Renagel®:

Beim Wirkstoff Poly(Allylaminhydrochlorid) war es nicht trivial zu bestimmen wie hoch die theoretische Phosphatbindekapazität sein müsste, denn vom Hersteller wurden keine Angaben zur Konzentration an Aminogruppen gemacht. Diese binden das Phosphat durch einen Austausch gegen Chloridionen, es war aber leider nicht möglich vorherzusagen, ob dieser Prozess vollständig abläuft. Das Fällungsprodukt des polymeren Wirkstoffs Sevelamer® war wie erwartet vollkommen röntgenamorph. Letztendlich wurde über den analytisch bestimmten Chloranteil des Medikaments auf die Menge der Aminogruppen zurückgeschlossen und dann davon ausgegangen, dass jede Gruppe ein Dihydrogenphosphat-Ion bindet. Basierend auf dieser Annahme band Renagel® bei einer Phosphatkonzentration von 6 mM 108 % der erwarteten Phosphatmenge, was dadurch erklärt werden konnte, dass im Wirkstoff mehr Aminogruppen als assoziierte Chloridionen vorhanden waren. Bei 3 mM wurden

nur noch 84 % des erwarteten Phosphats gebunden, was erneut eine Konzentrationsabhängigkeit der Bindekapazität zeigte.



**Abb. 4.3.8.3:** Statischer Versuch mit Renagel®

Mit dem in Abb. 4.3.8.3 gezeigten statischen Versuch mit 3 Tabletten Renagel® in 6 mM Phosphatlösung konnte auch erneut eine pH-Abhängigkeit der Phosphatbindekapazität nachgewiesen werden.

In der ersten Stunde lag der pH-Wert bei 2 und das Medikament entfaltete etwa ein Drittel der Wirksamkeit, die es danach bei neutralem pH-Wert erreichte. Es wurden 89% der theoretischen Phosphatbindekapazität erreicht, was damit zu erklären ist, dass die Phosphatkonzentration während des Versuchs unter 1 mM fiel und somit die zuvor angesprochene Konzentrationsabhängigkeit zum Tragen kam.

Diese wurde bereits von den Entwicklern des Medikaments festgestellt<sup>[91]</sup> und überrascht somit nicht. Die in vorliegenden Versuchen ermittelte pH-Anhängigkeit steht ebenfalls im Einklang mit der Literatur<sup>[91,92,109]</sup>.

Allgemein lässt sich sagen, dass Renagel® mit der eingesetzten empfohlenen Dosis von 3 Tabletten den höchsten absoluten Wert an gebundenem Phosphat von allen untersuchten Medikamenten erreichte.

### 4.3.9 Zusammenfassung und Vergleich

Der erstmals vorgenommene *in-vitro* Vergleich aller aktuell im Handel befindlichen Klassen an Phosphatbindern zeigte, dass prinzipiell alle Medikamente den Phosphatspiegel einer Lösung senken, wobei der vorrangige Faktor für eine möglichst hohe Menge an gebundenem Phosphat natürlich die Wirkstoffdosis ist. Kennt man diese, die voraussichtlichen chemischen Reaktionen und somit die Produkte in Verbindung mit Phosphat, so kann man Aussagen über die theoretische und praktisch erreichte Phosphatbindekazität eines Wirkstoffs treffen. Dies wurde in vorliegender Arbeit getan, und in den meisten Fällen wurden Kapazitäten ermittelt, die nah an den theoretischen Werten lagen. Für aufgetretene Abweichungen konnten Erklärungen gefunden werden.

Tabelle 4.3.9.1 vergleicht desweiteren die Tablettenmassen und setzt sie in Relation zur gebundenen Phosphatmenge bei beiden untersuchten Konzentrationen.

Medikament	Gewicht einer Tablette	Tabletten pro Versuch	[mg] gebundenes Phosphat pro [g] Tablette (3 mM)	[mg] gebundenes Phosphat pro [g] Tablette (6 mM)
Antiphosphat®	734 mg	2	163 mg g <sup>-1</sup>	151 mg g <sup>-1</sup>
Calciumacetat-Nefro®	906 mg	3	157 mg g <sup>-1</sup>	269 mg g <sup>-1</sup>
Calciumcarbonat® Fresenius	698 mg	3	463 mg g <sup>-1</sup>	520 mg g <sup>-1</sup>
Fosrenol®	3139 mg	1	181 mg g <sup>-1</sup>	180 mg g <sup>-1</sup>
Renagel®	927 mg	3	369 mg g <sup>-1</sup>	462 mg g <sup>-1</sup>

**Tab. 4.3.9.1:** Tablettenvergleich: Masse und Anzahl sowie relativ gebundene Phosphatmenge pro Gramm Tablette bei beiden untersuchten Konzentrationen

Es fällt auf, dass die sehr großen und schweren Fosrenol® Tabletten relativ wenig Wirkstoff enthalten, so dass sie in Bezug zu ihrer Masse vergleichsweise wenig Phosphat binden, obwohl der Wirkstoff Lanthancarboxonat konzentrations-

und pH-unabhängig Phosphat sogar über seine theoretische Bindekapazität hinaus aus den Lösungen entfernt. Alle anderen Medikamente binden bei höherer Konzentration auch mehr Phosphat, der niedrigere Wert beim Antiphosphat® kann durch die Löslichkeitsprobleme und dadurch entstandenen unterschiedlichen Konzentrationen an Wirkstoff während der durchgeführten Versuche erklärt werden.

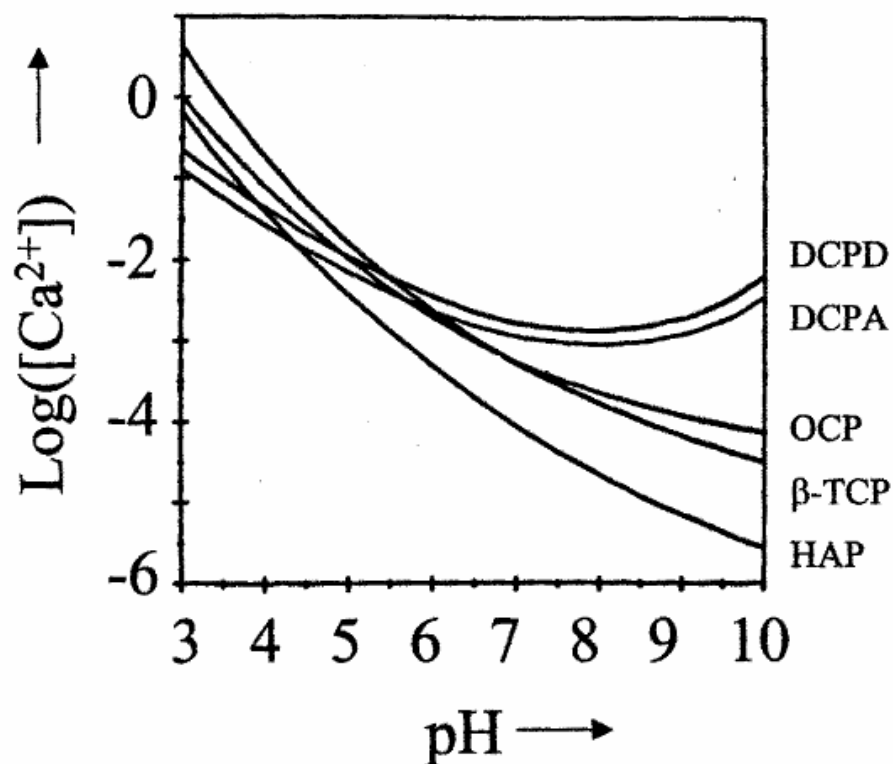
Die guten klinischen Ergebnisse im jahrzehntelangen Einsatz aluminiumhaltiger Phosphatbinder sind auf die längere Verweilzeit der Medikamente im Magen-Darm-Trakt zurückzuführen, wobei aber auch nicht klar ist, ob die Wirkung auf Lösung und Ausfällung oder auf Adsorption beruht. Nachgewiesen sind jedoch die vielen möglichen Langzeitfolgen für die Patienten, weshalb auch schon vor über zwanzig Jahren calciumhaltige Präparate als Ersatz eingeführt wurden.

Die beiden auf Calciumacetat und -carbonat beruhenden Medikamente unterschieden sich in den durchgeführten Versuchen dahingehend, dass Acetat durch seine Pufferwirkung zu einem deutlich niedrigeren pH-Wert im „Darm“ führte, also dem Versuchsbehälter, in dem die entstehenden Calciumphosphate auskristallisierten. Bei einem voreingestellten pH-Wert von 2 war das Auskristallisieren der Phosphate im „Magen“ nicht möglich, was zur Sicherheit noch in statischen Versuchen bestätigt wurde. Beim Acetat mit einem pH=6 entstand OCP, beim Carbonat mit einem pH=8.4 entstand HAP.

Abb. 4.3.9.2 zeigt die Löslichkeiten einiger wichtiger Calciumphosphate in Abhängigkeit vom pH-Wert. Dabei wird auch deutlich, dass die in den durchgeführten Versuchen festgestellten geringeren Phosphatbindekapazitäten des Calciumacetats in Zusammenhang mit dem niedrigeren pH-Wert am Ort der Kristallisation stehen. Denn obwohl drei Tabletten Calciumcarbonat® Fresenius nur 13 % mehr Calcium enthielten als 3 Tabletten Calciumacetat-Nefro® band ersteres fast 50 % mehr Phosphat. Dem gegenüber stehen die medizinischen Erfahrungen mit beiden Medikamenten, denn beim Menschen zeigen auf Acetat basierende Binder meist etwas bessere Ergebnisse<sup>[89]</sup>. Dies ist mit den Grenzen



der Anlage zu erklären, denn im menschlichen Magen-Darm-Trakt sind die pH-Werte besser gepuffert, es kommt daher nicht zu solch eklatanten Unterschieden und allgemein ist Acetat besser löslich als Carbonat. Ebenso ist die Verweilzeit im menschlichen Darm eine andere als in der entworfenen Anlage. Die Feststellung, dass bei calciumhaltigen Medikamenten die Phosphatbindekazität vom pH-Wert abhängt und bei höheren Werten steigt, wird auch durch frühere *in-vitro* Versuche bestätigt<sup>[110]</sup>.



**Abb. 4.3.9.2:** Löslichkeiten einiger wichtiger Calciumphosphate bei steigendem pH-Wert bezogen auf die Calciumkonzentration, entnommen aus<sup>[20]</sup>

Da eine Zufuhr von Calcium ebenfalls Nachteile für das komplexe System des Knochenstoffwechsels haben kann (siehe Kapitel 2.1.6), wurden in den 1990er Jahren mit lanthanhaltigen und polymerbasierten Präparaten zwei neue Klassen von Phosphatbindern eingeführt. Diese wurden mehrmals miteinander verglichen<sup>[25,92,94,110]</sup>, es konnte aber kein allgemeingültiger Trend oder eine klare Überlegenheit der einen oder anderen Medikamentenklasse festgestellt

werden. Die Studien widersprechen sich sogar teilweise, möglicherweise, weil viele von den jeweiligen Pharmakonzernen finanziert sind.

Bei den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuchen wurden zwar unterschiedliche Eigenschaften der Medikamente festgestellt, von einer Überlegenheit zu sprechen wäre jedoch nicht gerechtfertigt.

Fosrenol® band als einziges Medikament pH- und konzentrationsunabhängig eine Phosphatmenge, die den angenommenen Wert sogar um etwa 10% überstieg, wohingegen beim Renagel® eine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt wurde, die auch einige der oben genannten Studien bemerkten. Das polymerbasierte Präparat entfaltet seine volle Wirksamkeit auch erst im neutralen Bereich, was jedoch an seiner guten Phosphatbindekapazität im Versuch nichts änderte. Mit Calciumcarbonat® Fresenius zusammen erreicht es die höchste gebundene Phosphatmenge pro Tablettenmasse, die bei Fosrenol® aufgrund des hohen Tablettengewichts vergleichsweise niedrig lag. Es ist also zu erwarten, dass mehr Tabletten einen ähnlich hohen Wert an gebundenem Phosphat ergeben würden, wie es die drei Renagel® Tabletten taten.

Die calcium- und aluminiumfreien Präparate sind also beide in der Lage die früher eingeführten und noch heute eingesetzten Medikamente zu ersetzen, allerdings ist ihr deutlich höherer Preis wohl ein Grund, warum sie sich noch nicht vollständig durchgesetzt haben.

Rechnet man die in den vorliegenden Versuchen eingesetzten Tablettenmengen auf 3 tägliche Anwendungen hoch, so erreicht Antiphosphat® Kosten<sup>[93]</sup> von 2 €, Calciumacetat-Nefro® 1€, Calciumcarbonat® Fresenius 1 €, Fosrenol® 10 € und Renagel® 15 € (Preise von 2008 gerundet aus roter Liste®).

Möglicherweise können die Preise der neueren Präparate zukünftig durch größere Produktionsmengen oder Generika noch gesenkt werden, bis dahin werden die aluminium- und calciumhaltigen Phosphatbinder trotz ihrer Nachteile wohl kaum vom Markt verschwinden.

## 5. Zusammenfassung

Nadelförmiger Fluorapatit wurde im Rahmen dieser Dissertation reproduzierbar synthetisiert. Eine spezielle Ausrichtung mittels oberflächenaktiver Reagenzien kann darauf aufbauend angestrebt werden, ebenso eine Ausrichtung der Nadeln im elektrischen Feld, wenn die technische Umsetzung weiter optimiert wird. Kristallisationen unter Dialyse wurden durchgeführt und die Voraussetzungen für eine möglichst vollständige Dialyse wurden ermittelt.

Untersuchungen an menschlichen Zahnoberflächen bewiesen den Verlust an Zahnmaterial durch Ätzung mit Phosphorsäure, die standardmäßig zur Aufräuhung von Zähnen zur orthodontischen Befestigung von Zahnspangen eingesetzt wird. Ähnliche Effekte durch ein handelsübliches Bleichmittel zur Zahnaufhellung wurden nicht beobachtet, trotz der Aufnahme dreidimensionaler Oberflächenreliefs. Zahnpasten und Zahnspüllösungen zur Verringerung der Schmerzempfindlichkeit von Zähnen wurden untersucht. Die Größe und die Bestandteile der gefundenen Nano- bzw. Mikropartikel können prinzipiell zu einem Verschluss der Kanälchen in der durch Enamelabbau offengelegten Dentinschicht führen. Da diese Dentintubuli äußere Reize direkt zum Nerv weiterleiten, könnte deren zumindest teilweise Abdeckung zu einer geringeren Schmerzempfindlichkeit z. B. durch Temperaturänderungen führen.

Die Kapazitäten aller zurzeit handelsüblichen Phosphatbinderklassen zur Behandlung von Dialysepatienten wurden unter identischen Bedingungen für verschiedene Phosphatkonzentrationen bestimmt und in Beziehung zur theoretischen Phosphatbindekapazität des jeweiligen Wirkstoffs gesetzt. Ein unabhängiger Vergleich in dieser umfassenden Form wurde bis dahin noch nicht vorgelegt. Die Gegenüberstellung der unterschiedlichen Wirkweisen der Präparate könnte in Zukunft eine individuellere Verordnungspraxis ermöglichen.

## 6. Literatur

- [1] M. Epple, S. V. Dorozhkin, *Angewandte Chemie*, **114**, (2002), 3260.
- [2] O. Prymak, V. Sokolova, T. Peitsch, M. Epple, *Crystal Growth & Design*, **6**, (2006), 498.
- [3] J. Nyvlt, J. Ulrich, *Admixtures in crystallization*, VCH, Weinheim, (1995).
- [4] G. H. Nancollas, S. J. Zawacki, *Industrial Crystallisation*, **84**, (1984), 51.
- [5] H. Cölfen, M. Antonietti, *Angewandte Chemie*, **117**, (2005), 5714.
- [6] M. G. Page, H. Cölfen, *Crystal Growth & Design*, **6**, (2006), 1915.
- [7] D. Schwahn, Y. R. Ma, H. Cölfen, *Journal of Physical Chemistry C*, **111**, (2007), 3224.
- [8] D. McConnell, in *Apatite: its crystal chemistry, mineralogy, utilization, and biologic occurrences*, Springer, New York, (1973), 111.
- [9] D. K. Smith, in *Hydroxyapatite and related materials*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, (1994), 29.
- [10] U. Magdams, H. Gies, *European Journal of Mineralogy*, **16**, (2004), 261.
- [11] A. F. Hollemann, E. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, deGruyter, Berlin, (1995).
- [12] R. Z. LeGeros, *Calcium phosphates in oral biology and medicine*, Karger, Basel, (1991).
- [13] J. C. Elliot, *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*, **18**, Elsevier, Amsterdam, (1994).
- [14] R. Kniep, S. Busch, *Angewandte Chemie*, **108**, (1996), 2788.
- [15] I. Leveque, M. Cusack, S. A. Davis, S. Mann, *Angewandte Chemie-International Edition*, **116**, (2004), 903.
- [16] S. Busch, H. Dolhaine, A. DuChesne, S. Heinz, O. Hochrein, F. Laeri, O. Podebrad, U. Vietze, T. Weiland, R. Kniep, *European Journal of Inorganic Chemistry*, (1999), 1643.
- [17] S. Busch, U. Schwarz, R. Kniep, *Chemistry of Materials*, **13**, (2001), 3260.
- [18] S. Busch, U. Schwarz, R. Kniep, *Advanced Functional Materials*, **13**, (2003), 189.
- [19] P. Simon, W. Carrillo-Cabrera, P. Formanek, C. Göbel, D. Geiger, R. Ramlau, H. Tlatlik, J. Buder, R. Kniep, *Journal of Materials Chemistry*, **14**, (2004), 2218.
- [20] M. Epple, *Biomaterialien und Biomineralisation*, Teubner, (2003).
- [21] O. Prymak, Dissertation, Universität Duisburg-Essen, Essen, (2005).
- [22] R. F. Schmidt, G. Thews, F. Lang, *Physiologie des Menschen*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, (2000).
- [23] P. Karlson, D. Doenecke, J. Koolman, *Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, (1994).

- [24] W. J. Fassbender, V. M. Brandenburg, *Osteologie*, **16**, (2007), 1.
- [25] K. A. Hruska, S. Mathew, R. Lund, P. Qui, R. Pratt, *Kidney International*, **74**, (2008), 148.
- [26] *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, Walter de Gruyter, New York, (2002).
- [27] V. Brandenburg, in *Manuale Nephrologicum, Renaler Hyperparathyreoidismus: Pathophysiologie, Klinik und Therapie*, Dustri Verlag Dr. Karl Feistle, (in press).
- [28] W. Brötz, A. Schönbucher, *Technische Chemie I Grundverfahren*, Verlag Chemie, Deerfield Beach, Florida; Basel, (1982).
- [29] T. H. C. S. Leuna-Merseburg, *Lehrbuch der technischen Chemie*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, (1987).
- [30] A. Schönbucher, *Skript Vorlesung Technische Chemie I*, Essen, (2004).
- [31] P. J. Breton, *Scanning Microscopy*, **13**, (1999), 1.
- [32] C. W. Oatley, *The Scanning Electron Microscope - The Instrument*, Cambridge University Press, London, (1972).
- [33] G. D. Danilatos, *The Foundations of Scanning Electron Microscopy*, Academic Press, (1988).
- [34] E. Riedel, *Anorganische Chemie*, Walter de Gruyter Verlag, (2004).
- [35] Römpf, *Chemie-Lexikon, Edition CD-ROM*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, (1995).
- [36] S. Maganov, *Surface Analysis with STM and AFM*, VCH, Weinheim, (1996).
- [37] *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung*, Deutschland, (2001).
- [38] T. Peitsch, Diplomarbeit, University of Duisburg-Essen, Essen, (2005).
- [39] W. Kleber, H. J. Bautsch, J. Bohm, *Einführung in die Kristallographie*, Verlag Technik, Berlin, (1998).
- [40] V. Guillet, N. Gabas, M. Comtat, J. L. Favarel, *Journal of Applied Electrochemistry*, **32**, (2002), 1313.
- [41] M. Shablakh, L. A. Dissado, R. M. Hill, *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions II*, **79**, (1983), 1443.
- [42] C. Göbel, P. Simon, J. Buder, H. Tlatlik, R. Knierp, *Journal of Materials Chemistry*, **14**, (2004), 2225.
- [43] T. Peitsch, A. Klocke, B. Kahl-Nieke, O. Prymak, M. Epple, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **82A**, (2007), 731.
- [44] D. P. Robertsharry, *Lasers in Surgery and Medicine*, **12**, (1992), 467.
- [45] D. T. Millett, A. M. Glenney, C. R. Mattick, J. Hickman, N. A. Mandall, *Cochrane Database Systematic Reviews*, **3**, (2006), CD004485.
- [46] V. Cavalli, C. A. G. Arrais, M. Giannini, G. M. B. Ambrosano, *Journal of Oral Rehabilitation*, **31**, (2004), 155.
- [47] S. S. Azer, C. Machado, E. Sanchez, R. Rashid, *Effect of home bleaching systems on enamel nanohardness and elastic modulus*, Elsevier Sci. Ltd., (2009).

- [48] M. G. Buonocore, *Jornal of Dental Research*, **34**, (1955), 849.
- [49] R. L. Bowen, *Journal of Dental Research*, **35**, (1956), 360.
- [50] G. V. Newman, *American Journal of Orthodontics*, **51**, (1965), 901.
- [51] A. Boyde, A. D. G. Stewart, *Journal of Ultrastructure Research*, **7**, (1962), 159.
- [52] A. D. G. Stewart, A. Boyde, *Nature*, **196**, (1962), 81.
- [53] K. A. Galil, G. Z. Wright, *Journal of Dental Research*, **58**, (1979), 304.
- [54] L. M. Silverstone, C. A. Saxton, I. L. Dogon, O. Fejerskov, *Caries Research*, **9**, (1975), 373.
- [55] K. Laurell, E. Eltzroth, W. Johnston, *Journal of Dental Research*, **75**, (1996), 2114.
- [56] C. R. Mattick, R. S. Hobson, *Journal of Orthodontics*, **27**, (2000), 143.
- [57] C. D. Johnston, D. L. Hussey, D. J. Burden, D. Orth, M. Orth, *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, **109**, (1996), 531.
- [58] Z. C. Cehreli, N. Altay, *American Journal of Dentistry*, **13**, (2000), 64.
- [59] R. J. Radlanski, A. Jager, W. Seidl, G. Steding, *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, **43**, (1988), 1182.
- [60] H. E. Schröder, *Orale Strukturbiologie*, Georg Thieme Verlag, (1992).
- [61] A. J. Gwinnett, F. Garcia-Godoy, *American Journal of Dentistry*, **5**, (1992), 237.
- [62] W. N. Wang, T. C. Lu, *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, **100**, (1991), 72.
- [63] M. J. Shinci, K. Soma, N. Nakabayashi, *Dental Materials*, **16**, (2000), 324.
- [64] S. Inokoshi, H. Hosoda, C. Harnirattisai, Y. Shimada, *Operative Dentistry*, **18**, (1993), 8.
- [65] I. Krejci, P. Schupbach, F. Balmelli, F. Lutz, *Dental Materials*, **15**, (1999), 349.
- [66] B. Vanmeerbeek, S. Inokoshi, M. Braem, P. Lambrechts, G. Vanherle, *Journal of Dental Research*, **71**, (1992), 1530.
- [67] J. Artun, S. Bergland, *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, **85**, (1984), 333.
- [68] P. A. Cook, C. C. Youngson, *British Journal of Orthodontics*, **15**, (1988), 247.
- [69] M. Hannig, H. Bock, B. Bott, W. Hoth-Hannig, *European Journal of Oral Sciences*, **110**, (2002), 464.
- [70] A. Joiner, *Journal of Dentistry*, **34**, (2006), 412.
- [71] D. C. Sarrett, *Journal of the American Dental Association*, **133**, (2002), 1535.
- [72] R. S. McGuckin, J. F. Babin, B. J. Meyer, *Journal of Prosthetic Dentistry*, **68**, (1992), 754.
- [73] D. J. White, K. M. Kozak, J. R. Zoladz, H. J. Duschner, H. Gotz, *American Journal of Dentistry*, **17**, (2004), 5.
- [74] T. Al-Qunaian, *Operative Dentistry*, **30**, (2005), 265.

- [75] R. T. Basting, A. L. Rodrigues, M. C. Serra, *Journal of the American Dental Association*, **134**, (2003), 1335.
- [76] I. Potocnik, L. Kosec, D. Gaspersic, *Journal of Endodontics*, **26**, (2000), 203.
- [77] C. Kockapan, *Zeitschrift der türkischen Zahnärzte*, **1**, (1989), 9.
- [78] P. Diedrich, *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, **79**, (1981), 500.
- [79] A. Stassinakis, E. Colla, B. Hugo, P. Hotz, *Acta Medicinae Dentium Helvetica*, **3**, (1998).
- [80] J. Odegaard, D. Segner, *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, **94**, (1988), 201.
- [81] M. Tonelli, N. Wiebe, B. Culleton, A. House, C. Rabbat, M. Fok, F. McAlister, A. X. Garg, *Journal of the American Society of Nephrology*, **17**, (2006), 2034.
- [82] U. R. D. System, *Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States*, , US Renal Data System, (2003).
- [83] G. A. Block, F. K. Port, *American Journal of Kidney Diseases*, **35**, (2000), 1226.
- [84] R. N. Foley, P. S. Parfrey, M. J. Sarnak, *Journal of the American Society of Nephrology*, **9**, (1998), S16.
- [85] M. L. Melamed, J. A. Eustace, L. Plantinga, B. G. Jaar, N. E. Fink, J. Coresh, M. J. Klag, N. R. Powe, *Kidney International*, **70**, (2006), 351.
- [86] G. A. Block, P. Raggi, A. Bellasi, L. Kooienga, D. M. Spiegel, *Kidney International*, **71**, (2007), 438.
- [87] J. A. Coladonato, *Journal of the American Society of Nephrology*, **16**, (2005), S107.
- [88] E. Slatopolsky, *Journal of the American Society of Nephrology*, **14**, (2003), S297.
- [89] A. J. Hutchison, *Kidney International*, **75**, (2009), 906.
- [90] B. Kestenbaum, J. N. Sampson, K. D. Rudser, D. J. Patterson, S. L. Seliger, B. Young, D. J. Sherrard, D. L. Andress, *Journal of the American Society of Nephrology*, **16**, (2005), 520.
- [91] D. P. Rosenbaum, S. R. Holmes-Farley, W. H. Mandeville, M. Pitruzzello, D. I. Goldberg, *Nephrology Dialysis Transplantation*, **12**, (1997), 961.
- [92] V. Autissier, S. J. P. Damment, R. A. Henderson, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **96**, (2007), 2818.
- [93] R. L. S. GmbH, Rote Liste® Service GmbH **2008**.
- [94] H. H. Malluche, H. Mawad, *Nephrology Dialysis Transplantation*, **17**, (2002), 1170.
- [95] E. A. Larson, S. R. Ash, J. L. White, S. L. Hem, *Kidney International*, **29**, (1986), 1131.
- [96] W. H. Vanriemsdijk, J. Lyklema, *Journal of Colloid and Interface Science*, **76**, (1980), 55.

- [97] W. H. Vanriemsdijk, J. Lyklema, *Colloids and Surfaces*, **1**, (1980), 33.
- [98] A. B. Hodsman, D. J. Sherrard, A. C. Alfrey, S. Ott, A. S. Brickman, N. L. Miller, N. A. Maloney, J. W. Coburn, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **54**, (1982), 539.
- [99] S. Andreoli, J. Bergstein, D. Sherrard, *The New England Journal of Medicine*, **310**, (1984), 1079.
- [100] M. Ketteler, *Der Nephrologe*, **3**, (2008), 96.
- [101] A. S. Posner, F. Betts, *Accounts of Chemical Research*, **8**, (1975), 273.
- [102] F. H. Firsching, S. N. Brune, *Journal of Chemical & Engineering Data*, **36**, (1991), 93.
- [103] F. Albaaj, A. J. Hutchison, *International Journal of Clinical Practice*, **59**, (2005), 1091.
- [104] W. F. Finn, *Clinical Nephrology*, **65**, (2006), 191.
- [105] A. Hutchison, Oxford Univ Press, **2005**, pp. V5.
- [106] M. Pennick, K. Dennis, S. J. P. Damment, *Journal of Clinical Pharmacology*, **46**, (2006), 738.
- [107] F. Fernandezgavarron, T. Huque, J. L. Rabinowitz, J. G. Brand, *Bone and Mineral*, **3**, (1988), 283.
- [108] J. L. Rabinowitz, F. Fernandez-Gavarron, J. G. Brand, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **24**, (1988), 229.
- [109] A. Capitanini, A. Lupi, F. Osteri, I. Petrone, C. Del Corso, M. Straniti, M. Gallieni, A. Rossi, *Clinical Nephrology*, **64**, (2005), 320.
- [110] M. S. Sheikh, J. A. Maguire, M. Emmett, C. A. S. Ana, M. J. Nicar, L. R. Schiller, *Journal of Clinical Investigation*, **83**, (1989), 66.



## 7. Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Abb.	Abbildung
AFM	Atomic Force Microscopy
BR	Batchreaktor
CSTR	Continuously stirred tank reactor
ESEM	Environmental Scanning Electron Microscope
h	Stunde
HAP	Hydroxylapatit
L	Liter
LFD	large field detector
mg	Milligramm
$\mu\text{m}$	Mikrometer
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mL	Milliliter
mmol	Millimol
nm	Nanometer
OCP	Octacalciumphosphat
Pa	Pascal
PFTR	Plug flow tube reaktor
REM	Rasterelektronenmikroskop
SBR	Semi-Batch Reaktoren
XRD	Röntgendiffraktometrie

## Publikationsliste

### A) Reguläre Publikationen in referierten wissenschaftlichen Fachzeitschriften (regular papers in refereed journals)

- [145] O. Prymak, V. Sokolova, T. Peitsch, M. Eppe, "The crystallization of fluoroapatite dumbbells from supersaturated aqueous solution", **Crystal Growth & Design** **6** (2006) 498-506.
- [169] T. Peitsch, A. Klocke, B. Kahl-Nieke, O. Prymak, M. Eppe, "The release of nickel from orthodontic NiTi wires is strongly increased by dynamic mechanical loading but not constrained by surface nitridation", **Journal of Biomedical Materials Research** **82A** (2007) 731-739.
- [212] R.G. Simões, A.I. Aleixo, A.L.C. Lagoa, M.E.M. da Piedade, J.P. Leal, T. Peitsch, M. Eppe, "Thermoanalytical and structural characterization of fluoridated calcium phosphates prepared in anhydrous alcohols", **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry** (accepted).

### B) Sonstige Publikationen, Kurzbeiträge, zitierfähige Konferenzabstracts (other publications) :

- [55] T. Peitsch, O. Prymak, A. Klocke, B. Kahl-Nieke, M. Eppe, "Ermüdungsbeständigkeit und Nickelfreisetzung von orthodontischen Drähten auf NiTi-Basis (Nitinol®)", **Bio-materialien** **6** (2005) 198.

### D) Wissenschaftliche Vorträge (scientific lectures, P=poster, V=lecture) :

- [321] 8th International Symposium Biomaterials and Biomechanics: Fundamentals and Clinical Applications, 21.-23.09.2005, Essen, O. Prymak, T. Peitsch, A. Klocke, B. Kahl-Nieke, M. Eppe, "Fatigue resistance and nickel release of NiTi-based orthodontic wires" (P)
- [329] Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Würzburg, 07.-08.10.2005, T. Peitsch, O. Prymak, A. Klocke, B. Kahl-Nieke, M. Eppe, "Ermüdungsbeständigkeit und Nickelfreisetzung von orthodontischen Drähten auf NiTi-Basis (Nitinol®)" (V)
- [349] 2006 MRS Spring Meeting, San Francisco, 17.-21.04.2006, O. Prymak, T. Peitsch, A. Klocke, B. Kahl-Nieke, M. Eppe, "Fatigue resistance and nickel release of coated and uncoated NiTi orthodontic wires" (P)
- [373] 13. Heiligenstädter Kolloquium "Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt", Heiligenstadt, 25.-27.09.2006, T. Peitsch, O. Prymak, A. Klocke, B. Kahl-Nieke, M. Eppe, "Die Freisetzung von Nickel aus dynamisch-mechanisch belasteten orthodontischen NiTi-Drähten" (V)
- [375] Deutsche Gesellschaft für Kieferorthopädie, 79. Wissenschaftliche Jahrestagung, Nürnberg, 06.-09.10.2006, A. Klocke, T. Peitsch, O. Prymak, B. Kahl-Nieke, M. Eppe, "Nickelfreisetzung aus beschichteten und unbeschichteten Nickel-Titan-Drähten" (V)
- [422] 2007 MRS Fall Meeting, Boston (USA), 26.11.-30.11.2007, T. Peitsch, O. Prymak, M. Eppe, A. Klocke, B. Kahl-Nieke, "On the release of nickel from dynamically loaded orthodontic wires" (V)

## Lebenslauf

Name: Thorsten Peitsch

Geburtsdatum: 30.10.1979

Geburtsort: Essen

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: ledig



## Werdegang:

---

- Seit 2006  
Doktorand an der Universität Duisburg-Essen
- Oktober 2000 – Dezember 2005  
Studium an der Universität Duisburg-Essen  
Abschluss: Diplom-Chemiker
- Juli 1990 - Mai 1999  
Leibniz-Gymnasium in Essen; Abschluss: allgemeine Hochschulreife
- 1986 - 1990  
Neuessener Schule in Essen

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Synthese und Untersuchung von künstlichen und natürlichen  
Calciumphosphaten sowie Kapazitätsbestimmung von Phosphatbindern ”

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen  
benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner  
anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im September 2009

Name

## **Danksagung**

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Matthias Epple für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren und die stetige Unterstützung während dieser langen Zeit.

Mein herzlicher Dank geht ebenfalls an Herrn Prof. Dr. Axel Schönbucher für die Übernahme des Koreferats dieser Arbeit.

Den ehemaligen und aktuellen Kollegen innerhalb des AK Epple möchte ich für die stets gute Zusammenarbeit und die vielen netten gemeinsamen Stunden sowohl auf der Arbeit als auch privat danken.

Selbst in schwierigen Zeiten haben wir uns immer wieder gegenseitig aufgerichtet und ich denke nicht, dass ich jemals wieder so gute Freunde im Berufsleben finden werde.

Mein Dank gilt auch den Projektpartnern Herrn Prof. Dr. Arndt Klocke (zuvor UKE Hamburg-Eppendorf, heute University of California, San Francisco) und Herrn Dr. Ljubisa Markovic (Private Universität Witten/Herdecke).

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Suzan Tug, für die Korrektur dieser Arbeit, aber vor allem für ihr Verständnis und ihre Liebe in den vergangenen sieben Jahren, die nicht immer einfach waren.